



TITLE:

マウス単離膵島におけるインスリン分泌時の細胞内ATPダイナミクスの計測( Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

田中, 喬

---

CITATION:

田中, 喬. マウス単離膵島におけるインスリン分泌時の細胞内ATPダイナミクスの計測. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18430>

RIGHT:

許諾条件により本文は2015-03-01に公開; 許諾条件により要旨は2014-06-23に公開

マウス単離膵島におけるインスリン  
分泌時の細胞内 ATP ダイナミクスの  
計測

田中 喬

## 目次

表紙	1
目次	2
要旨	3
略語表	5
序論	6
結果	9
考察	16
実験材料、方法	20
参考文献	22
謝辞	27
図	28

## 要旨

我々ヒトでは血糖値はさまざまなホルモンによって調節されている。その中でも膵臓の $\beta$ 細胞より分泌されるインスリンは、血糖値を下げることのできるホルモンである。これまでグルコース刺激によるインスリン分泌については広く以下の代謝説が支持されてきた。食事等により血中のグルコース濃度が高くなると、グルコーストランスポーターを介してグルコースが $\beta$ 細胞内へと取り込まれる。そして解糖系や TCA サイクルを経て代謝され、ATP が合成される。ATP が ATP 感受性カリウム( $K_{ATP}$ )チャネルを閉じることで細胞膜の脱分極が生じ、電位依存性カルシウムチャネルが開き、 $Ca^{2+}$ が細胞内へと流入する。その結果、インスリン顆粒がエキソサイトーシスにより分泌される。これまでの研究で、細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度がインスリン分泌の際に劇的に変化すること、またインスリンが細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度と同期して分泌されることが分かっている。グルコースによるエネルギー代謝の活性化とインスリン分泌とを結びつける上で ATP が非常に重要な因子であると考えられるが、実際に ATP がインスリン分泌の際に細胞内でどのような挙動を示すのかといった ATP の時空間的ダイナミクスはこれまであまり明らかにされてこなかった。近年になり、生きた細胞内の ATP 濃度の可視化を可能にする ATP バイオセンサーが開発された。そこで私はこの ATP バイオセンサー (GO-ATeam) と  $Ca^{2+}$ を検出する蛍光色素(fura-2)を組み合わせ、マウスの単一の生きた単離膵島において ATP と  $Ca^{2+}$ がインスリン分泌時にどのような挙動を示すのかを観察し、インスリン分泌がどのように制御されているのかを明らかにしようと試みた。

私は、グルコース、メチルピルビン酸、グルタミン/ロイシン刺激によってミトコンドリア、細胞質 ATP 濃度の増加に続いて細胞質  $Ca^{2+}$ 濃度の急速な増加(第1相)を観察することができた。エネルギー代謝の阻害剤により ATP の合成を阻害すると、これら刺激を行っても細胞質 ATP 濃度の増加は見られなくなり、細胞質  $Ca^{2+}$ 濃度の急速な増加も観察することはできなかった。このことから、細胞質 ATP 濃度の増加が  $Ca^{2+}$ 濃度の第1相の急速な増加に必要であると考えられた。グルコース刺激によるエネルギー代謝の活性化の後、細胞質 ATP 濃度は高いレベルで維持されていた。一方、細胞質  $Ca^{2+}$ 濃度は急速な増加の後しばらくしてオシレーション(第2相)という挙動を示した。しかし  $Ca^{2+}$ オシレーション時に細胞質 ATP 濃度の明確なオシレーションを観察することはできなかった。その後阻害剤でエネルギー代謝をブロックあるいはグルコース濃度を低下させエネルギー代謝を抑制すると、細胞質 ATP 濃度が下がりだし、その直後から  $Ca^{2+}$ オシレーションも停止した。これら結果より、細胞質 ATP 濃度がオシレーションするのではなく高いレベルで維持されていることが第2相の  $Ca^{2+}$ オシレーションに必要であると考えられた。またグルコース刺激による  $Ca^{2+}$ オシレーションが観察される条件下(>~6 mM グルコース)でグルコース濃度を変化させると、グルコース濃度を上げた

場合、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションは続いていたが、濃度を下げるとすぐに停止し、しばらくして再開した。さらに  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルのブロッカーであるトルブタミドを用いて同様の実験を行うと、トルブタミド濃度を下げた場合に  $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションが一時的に停止した。これら結果からリガンド(ATP あるいはトルブタミド)の絶対濃度のみならずそれらの濃度変化も  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルを制御し、 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの有無を決定していると考えられた。

## 略語表

GSIS	グルコース依存性インスリン分泌
K <sub>ATP</sub> チャンネル	ATP 感受性 K <sup>+</sup> チャンネル
SUR	スルホニルウレア受容体
Kir6.X	内向き整流性 K <sup>+</sup> チャンネル
GLUT	グルコーストランスポーター
VDCC	電位依存性 Ca <sup>2+</sup> チャンネル
FRET	フェルスター共鳴エネルギー移動
[ATP] <sub>c</sub>	細胞質 ATP 濃度
[ATP] <sub>m</sub>	ミトコンドリアマトリック内 ATP 濃度
$\Delta$ [ATP] <sub>c</sub>	細胞質 ATP 濃度変化
[ATP] <sub>pm</sub>	細胞膜直下における ATP 濃度
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	細胞質 Ca <sup>2+</sup> 濃度
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>pm</sub>	細胞膜直下における Ca <sup>2+</sup> 濃度
MP	メチルピルビン酸
GDH	グルタミン酸脱水素酵素
KRH 培地	Krebs-Ringer-Hepes 培地

## 序論

我々ヒトでは血糖値はさまざまなホルモンによって調節されている。その中でも膵臓の $\beta$ 細胞より分泌されるインスリンは、血糖値を下げることのできるホルモンである。これまでの研究から $\beta$ 細胞内の ATP がグルコース刺激によるインスリン分泌に深く関係していると考えられてきた(GSIS; glucose-stimulated insulin secretion)。特に、ATP あるいは ATP/ADP 比によって閉じられる ATP 感受性  $K^+$ ( $K_{ATP}$ )チャネルがインスリン分泌に重要な役割を果たしていると考えられている(1、2)。 $K_{ATP}$ チャネルは細胞内の代謝状態と細胞膜の興奮性を結びつけている  $K^+$ チャネルであり、ABC タンパクファミリーに属するスルホニルウレア受容体(SUR)と膜 2 回貫通型の内向き整流性  $K^+$ チャネルである Kir6.X から構成される 4:4 のヘテロ八量体である(3、4)。この  $K_{ATP}$ チャネルは $\beta$ 細胞、心筋細胞、平滑筋細胞などに発現しており、 $\beta$ 細胞では SUR1 と Kir6.2 の組み合わせで構成されている。Kir6.2 のドミナントネガティブフォームを発現したマウスは新生児期に高インスリン症低血糖を引き起こし、成長すると $\beta$ 細胞数の減少ならびに低インスリン症高血糖を引き起こすことが知られている(5)。また Kir6.2 ノックアウトマウスでは高グルコースやスルホニルウレアによるインスリン分泌が抑制されることも分かっている(6)。

グルコース刺激によるインスリン分泌についてはこれまで広く以下の代謝説(Fig. 1)が支持されてきている。食事等により血中のグルコース濃度が高くなると、グルコーストランスポーター(GLUT)を介してグルコースが $\beta$ 細胞内へと取り込まれる。グルコースは解糖系や TCA サイクルを経て代謝されその結果、ATP が合成される。ATP が  $K_{ATP}$ チャネルを閉じることで細胞膜の脱分極が生じ、電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネル(VDCC)が開き、 $Ca^{2+}$ が細胞内へと流入する。その結果、インスリン顆粒がエキソサイトーシスにより分泌される。これまでの研究で、細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度がインスリン分泌の際に劇的に変化すること、またインスリンが細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度と同期して分泌されることが分かっている(7)。また細胞内  $Ca^{2+}$ の挙動については、グルコース刺激後の最初の流入である第 1 相とそれに続いて起こるオシレーションという第 2 相の 2 つのフェーズが存在することが知られている(7、8、9)。

一方 ATP のダイナミクスについては未だ不明な点が多い。これまでの酵素学的あるいは化学的手法を用いた ATP の測定の結果、 $\beta$ 細胞内の ATP レベルはグルコース刺激で増加する(10、11、12)という報告とそれとは逆にあまり増加しない(13、14)という報告がなされてきた。細胞内 ATP のターンオーバーは早く、細胞から ATP を抽出する過程の中でも ATP は分解されうる。そのためこれまでの ATP を測定する酵素学的あるいは化学的手法では実際の ATP 量を正確に計ることは難しいと考えられる。またこのように細胞を破碎して抽出液を用いる方法では全細胞の平均値しか分からなく、個々の細

胞の ATP 濃度は分からない。さらに細胞内 ATP 濃度の時間的、空間的情報も失われてしまう。従って、インスリン分泌時の実際の細胞内 ATP 濃度のダイナミクスを知るためには、細胞を破碎せずに生きた状態で細胞内 ATP 濃度を可視化する手法が必要である。近年、ATP/ADP 比を可視化できる蛍光プローブ(Perceval)が開発され(15)、これを用いた膵島ライブイメージングの報告もなされてきた(16、17)。しかし、細胞内 ATP 濃度のダイナミクスそれ自体や、第 1 相の  $\text{Ca}^{2+}$  の挙動との関連性についてはこれまで検討されてこなかった。第 2 相の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションのメカニズムについても完全には理解されていない。グルコース刺激により単離 $\beta$ 細胞の細胞膜電位が細かいスパイクを含有したオシレーションを示し(8)、そのオシレーションが  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと同期することが報告されている(18)。また高グルコース条件にすると  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの活動がいったんは低下するが、グルコース濃度に変化がないにも関わらずしばらくするとその  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルが開くことが電気生理学的研究で明らかにされていることから、 $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル活性がオシレーションすることが細胞膜電位のオシレーション、さらには  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを誘導していると考えられる(19)。しかし、このオシレーションの発生源は何であるのか、またどのように制御されているのかなどは、これまで解明されていない。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと細胞質 ATP 濃度との相関についてもまだはっきりと分からない。

最近になり、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した ATP バイオセンサー(ATeam1.03, GO-ATeam)が開発された(20、21)。FRET は 2 つの蛍光物質の間で距離と相対角度に応じて励起エネルギーが移動する物理現象であり、タンパク質内の構造変化やタンパク質間の相互作用を測定する手法として用いられている。ATeam1.03 は、CFP のバリエーションである単量体 super-ECFP (enhanced cyan fluorescent protein、以下 CFP)と YFP のバリエーションである単量体 Venus (以下 YFP)を *Bacillus subtilis* の  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP 合成酵素の  $\epsilon$  サブユニットの N 末と C 末にそれぞれ付加した構造をしている(20、Fig. 2 A)。また GO-ATeam は *Fungia* の OFP のバリエーションである単量体 KO $\kappa$  (kusabira orange、以下 OFP)と *Aequoria* の GFP のバリエーションである円順列変異体 cp173-単量体 EGFP (enhanced green fluorescent protein、以下 GFP)を *Bacillus subtilis* の  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP 合成酵素の  $\epsilon$  サブユニットの N 末と C 末にそれぞれ付加した構造をしている(21、Fig. 2 B)。ATP が存在しない時、これら ATP バイオセンサーを構成する 2 つの蛍光タンパク質(CFP と YFP、および OFP と GFP)は FRET が生じる距離にない。よってこの場合ドナーである CFP あるいは GFP を励起(CFP の場合 435 nm、GFP の場合 470 nm)してもアクセプターとなる YFP や OFP にはエネルギーが移動せず、CFP あるいは GFP の蛍光(CFP の場合 475 nm、GFP の場合 510 nm)が検出される。しかし ATP が  $\epsilon$  サブユニットに結合すると、これら ATP バイオセンサーの構造が劇的に変化し、2 つの蛍光タンパク質の距離が近くなる。すると CFP あるいは GFP (CFP の場合 435 nm、GFP の場合 470 nm)を励起すると FRET が生じ、YFP あるいは OFP にエネルギーが移動することで、YFP あるいは OFP の蛍光(YFP の場合 527 nm、



OFP の場合 560 nm)を計測することができる。従って、この蛍光強度比(YFP/CFP および OFP/GFP)を FRET 効率と定義し、この変化を観測することで細胞内の ATP 濃度の変化を可視化することができる。またこれらの ATP バイオセンサーは ATP に対する親和性が高く、ADP、GTP といった他のヌクレオチドに対して非感受性である。さらに生理学的な条件(pH7 付近)では pH 変化による FRET 効率の変化もほとんど起きない。特に GO-ATeam は  $\text{Ca}^{2+}$ の蛍光指示薬として広く用いられる fura-2 とスペクトルの重なりがほとんどないので、単一細胞において ATP と  $\text{Ca}^{2+}$ の同時イメージングをすることが可能である(21)。fura-2 は、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高くなると 340 nm 励起の蛍光強度が上昇し、380 nm 励起の蛍光強度が低下する。その時の蛍光強度比( $R=F_{340}/F_{380}$ 、以下 fura-2S/fura-2L)を計測することで  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を知ることができる。そこで私は、マウスより単離した膵島においてこの ATP バイオセンサーと fura-2 を共に用いることで、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ )と共に細胞質 ATP 濃度( $[\text{ATP}]_c$ )やミトコンドリア ATP 濃度( $[\text{ATP}]_m$ )を可視化することで、インスリン分泌において細胞内 ATP のダイナミクスがどのように $[\text{Ca}^{2+}]_c$ を制御しているのかを検討した。

## 結果

### MIN6 細胞における $[ATP]_c$ の挙動

初めに私は、GO-ATeam1 がインスリン分泌細胞内で ATP の変化に応じて FRET 効率(OFP/GFP)を変化させているのかを調べた。アデノウイルスによって GO-ATeam1 を発現させた MIN6(マウスインスリノーマ)細胞の細胞膜を $\alpha$ -hemolysin によって透過化し、培地中の ATP の濃度を変化させ、FRET 効率を測定した。すると培地中の ATP の濃度変化に応じて FRET 効率が変化した(Fig. 3 A)。このことから GO-ATeam1 がきちんとインスリン分泌細胞で機能していると考えられた。次に ATP 濃度を 7 mM と 8 mM の間で交互に変化させた際に、FRET 効率の変化が見られるのかどうかを確認した。すると ATP 濃度 1 mM の違いで  $3.3 \pm 0.8 \%$  (mean $\pm$ S.D. n=10)の FRET 効率の変化が見られた(Fig. 3 B)。このことから、GO-ATeam1 は 1 mM 程度の ATP 濃度の違いであれば十分検出することができると考えられた。

そこで次に、MIN6 細胞についてグルコース刺激を行った時の細胞内 ATP の濃度変化を測定しようと考えた。GO-ATeam1 を発現させた MIN6 細胞を 2.8 mM グルコース入りの KRH 培地で前培養を行い、グルコース濃度を 25 mM に変化させた時の FRET 効率(OFP/GFP)の変化を測定した。するとグルコース刺激により  $5 \pm 2 \%$  (mean $\pm$ S.D. n=22)の FRET 効率の増加がイメージングを行った 73 %の細胞で見られた(Fig. 3 C)。一方理由は不明であるが、残りの 27 %の細胞では顕著な FRET 効率の変化は見られなかった。これら変化が見られなかった細胞のデータは Fig. 3 C には含んでいない。

### 単離膵島におけるグルコース刺激時の $[ATP]_c$ と $[ATP]_m$ の挙動

次に私はマウスより膵島を単離しアデノウイルスを用いて GO-ATeam1 を発現させ、グルコース刺激を行った際の ATP の挙動を測定した。2.8 mM グルコース入りの KRH 培地で前培養を行い、その後グルコース濃度を 25 mM まで変化させると、FRET 効率(OFP/GFP)の急速な増加が見られた(Fig. 4 A)。こうした急速な増加は、ATP と結合できないようにバイオセンサーの  $F_oF_1$ -ATP 合成酵素の  $\epsilon$  サブユニットに変異(R122K/R126K)を入れた GO-ATeam3 を用いた場合では観察されなかった(Fig. 4 B)。これら結果から、高グルコース刺激によって観察された FRET 効率の増加は、 $[ATP]_c$  の上昇によるものであると考えられる。さらにグルコース刺激をしてから GO-ATeam1 の FRET 効率が増加するまでの時間は  $22 \pm 6$  秒 (mean $\pm$ S.D. n=13)であり、急速な増加の後、 $[ATP]_c$  は高いレベルで維持されていた。また 2~20 mM の ATP を検出できる GO-ATeam1 の代わりに 1~10 mM の ATP を検出できる ATeam1.03 (20)を発現さ

せた膵島についても高グルコース刺激を行うと、GO-ATeam1 を発現させた場合と同様に FRET 効率(YFP/CFP)の急速な増加が見られた(Fig. 4 C)。次に様々な濃度のグルコースで刺激を行った際の[ATP]<sub>c</sub>を測定した。その結果、刺激したグルコース濃度に応じて[ATP]<sub>c</sub>の急速な増加が見られた(Fig. 4 D)。具体的には、同一膵島に対して、8.3 mM、16.7 mM、25 mM のグルコース刺激を行うと、それぞれ  $6 \pm 3$ 、 $13 \pm 2$ 、 $15 \pm 3$  % (mean $\pm$ S.D. それぞれ n=10)の FRET 効率の急速な増加が見られ、その後一定に保たれた(Fig. 4 E)。グルコース濃度を急激ではなく、段階的に増加させた場合、[ATP]<sub>c</sub>も徐々に増加していった(Fig. 4 F)。またグルコース濃度を急激に変化させた場合と徐々に変化させた場合とで、FRET 効率の増加率については大きな差異は認められなかった。さらに単離した膵島をトリプシンで単一細胞レベルにしてからグルコース刺激を行った。すると膵島イメージングでの結果と同様に 25 mM グルコース刺激で  $11 \pm 3$  % (mean $\pm$ S.D. n=11)の FRET 効率の増加が見られた (Fig. 4 G)。

次にグルコース濃度を下げた際の細胞質 ATP の挙動を調べる目的で、グルコース濃度を 2.8 mM と 25 mM の間で交互に変化させた。すると予想通り、グルコース濃度を下げると[ATP]<sub>c</sub>も減少した(Fig. 5 A)。このグルコース濃度低下による[ATP]<sub>c</sub>の減少はグルコース濃度上昇による[ATP]<sub>c</sub>の増加よりも遅く、FRET 効率が減少する速度は増加する時と比べておよそ 1/6 であった(Fig. 5 B)。また FRET 効率が 50 %変化するまでにかかる時間はグルコース濃度を上げてからおよそ 90 秒であったのに対して、グルコース濃度を下げた場合はおよそ 340 秒を費やした(Fig. 5 C)。グルコース濃度低下時の[ATP]<sub>c</sub>の減少が比較的緩やかであった理由は、低グルコースにすることでそれまで行われていた ATP 消費(インスリン分泌、Ca<sup>2+</sup>くみ出しなど)が抑えられた結果ではないかと考えられる。次に高グルコース刺激による[ATP]<sub>c</sub>の増加が解糖系やミトコンドリアでのエネルギー代謝の活性化によって引き起こされていることを確認する目的で、グリセロアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を阻害するヨード酢酸や、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素を阻害するオリゴマイシン A 処理時の FRET 効率の変化を観察した。膵島を 25 mM グルコース入りの KRH 培地で前培養を行いその後、ヨード酢酸やオリゴマイシン A で処理すると、いずれの場合も FRET 効率が減少した(Fig. 6)。

また膵島には 80 %近い $\beta$ 細胞の他にも $\alpha$ 細胞や $\delta$ 細胞といった細胞も含まれている(22)。そこで単離した膵島の $\beta$ 細胞内でグルコース刺激による FRET 効率の増加が見られるのかを確認するために、RIP (rat insulin promoter)支配下で GO-ATeam1 を発現するトランスジェニックマウス(未発表)を京都大学大学院医学系研究科の長嶋一昭先生より分けていただき、このマウスの膵島を単離して[ATP]<sub>c</sub>をモニターした。すると 25 mM グルコース刺激により FRET 効率が増加した(Fig. 7)。この結果から単離した $\beta$ 細胞内でもグルコース刺激によって[ATP]<sub>c</sub>が増加することが確認できた。

最後にグルコース刺激によってミトコンドリアでのエネルギー代謝が活性化するかどうかを調べる目的で、GO-ATeam1 の N 末にチトクロム c 酸化酵素のサブユニットⅧに存在するミトコンドリア局在シグナルを付加し、ミトコンドリアマトリックスに

局在するように設計した GO-ATeam1 (mitGO-ATeam1)を膵島に発現させた。すると 25 mM グルコース刺激により  $[ATP]_m$  の急速な増加が観察された(Fig. 8 A)。細胞質の場合と同様に mitGO-ATeam3 を発現させた場合では FRET 効率に変化は見られなかった(Fig. 8 B)。これら結果は、グルコース刺激によって単離膵島細胞内のミトコンドリアでの ATP の合成が活性化されたことを示している。

### 単離膵島におけるグルコース刺激時の $[ATP]_c$ 、 $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動

ATP は  $K_{ATP}$  チャンネルに結合してその活性を阻害することから、エネルギー代謝の活性化の結果、 $[ATP]_c$  の増加がインスリン分泌を誘導するのに必要であると考えられる。そこで私は単離膵島を用いて  $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  の同時イメージングを行った。すると全ての膵島について、25 mM グルコース刺激によって  $[ATP]_c$  の急速な増加が始まってから  $96 \pm 33$  秒 (mean  $\pm$  S.D.  $n=19$ ) 後に、 $[Ca^{2+}]_c$  の増加が見られた(Fig. 9 A および B)。この  $[ATP]_c$  の増加や  $[Ca^{2+}]_c$  の増加は膵島内の全ての細胞で同時に開始されていた。この結果は、ATP/ADP 比のバイオセンサーである Perceval を用いた過去の結果(16, 17) とほぼ一致している。また  $[ATP]_m$  と  $[Ca^{2+}]_c$  の同時イメージングを行うと  $[Ca^{2+}]_c$  の増加の前に  $[ATP]_m$  の増加が開始された(Fig. 9 C)ことから、ミトコンドリアでの ATP 合成の活性化によって起こる  $[ATP]_c$  の増加が  $[Ca^{2+}]_c$  の第 1 相の増加に必要であることが示唆された。そこでこれを確認する目的で、エネルギー代謝の阻害剤で膵島を処理した後にグルコース刺激を行い、その時の  $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  をイメージングした。すると、ヨード酢酸をおよそ 6 分間、あるいはオリゴマイシン A を 1.5~3 分間処理した膵島に対して 25 mM グルコース刺激を行うと、 $[ATP]_c$  の増加は見られなくなった。一方  $[Ca^{2+}]_c$  については  $[ATP]_c$  の減少と並行してレシオ比(fura-2S/fura-2L)が徐々に微増したが、グルコース刺激後の急速な増加は見られなくなった(Fig. 10 A および C)。 $[Ca^{2+}]_c$  が微増した理由は、おそらく  $[ATP]_c$  が減少することで ATP を用いて  $Ca^{2+}$  をくみ出す小胞体や細胞膜に存在する  $Ca^{2+}$  ポンプの働きが抑えられた結果ではないかと考えられる。ヨード酢酸やオリゴマイシン A 処理によっても、 $K_{ATP}$  チャンネルブロッカーであるトルブタミド処理による  $[Ca^{2+}]_c$  の増加ははっきり見られた(Fig. 10 B および D)ことから、数分間エネルギー代謝阻害剤で膵島を処理しても、 $\beta$ 細胞は  $K_{ATP}$  チャンネルを閉じ、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル(VDCC)を開くことはできると考えられる。これら結果は、グルコース刺激によるエネルギー代謝の活性化は解糖系と酸化的リン酸化に依存して、 $[Ca^{2+}]_c$  の第 1 相の増加に必要であることを強く示唆している。

### 単離膵島におけるメチルピルビン酸刺激時の $[ATP]_c$ 、 $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動

次に、グルコース以外でエネルギー代謝を活性化させた時の、細胞内 ATP 濃度と  $Ca^{2+}$  濃度をモニターした。解糖系の最終産物であるピルビン酸はミトコンドリアに入り、ア

セチル CoA に変換され、さらに代謝される。ラットのインスリン分泌細胞株である INS-1 823/13 細胞(23)ではピルビン酸刺激により  $[ATP]_m$  が増加することが報告されている(24)が、単離 $\beta$ 細胞においてはインスリン分泌を引き起こさない(25)。これは INS-1 細胞と異なり、単離 $\beta$ 細胞では miR-29a や miR-29b といったマイクロ RNA によりモノカルボン酸輸送体の発現が抑制されていることに起因していると考えられる(26)。それに対して、メチルピルビン酸はインスリン分泌を誘導することが知られている。これまでの研究では、メチルピルビン酸によるインスリン分泌は、代謝の活性化による ATP の合成によって誘導されるという説(27、28)と、ATP の合成とは関係のない経路で誘導されるという説(12、25)が存在していた。そこで私はメチルピルビン酸が ATP の合成を活性化させて、 $Ca^{2+}$ の流入を引き起こすのかを検討するために、グルコースを含まない KRH 培地で単離膵島を前培養し、20 mM のメチルピルビン酸刺激を行い、細胞内 ATP 濃度の変化を観察した。するとメチルピルビン酸刺激により  $[Ca^{2+}]_c$  の増加に先んじて、 $[ATP]_m$  と  $[ATP]_c$  の急速な増加が観察された(Fig. 11 A および B)。メチルピルビン酸により培地 pH は 7.4 から 7 に低下したが、GO-ATeam1 の特性から、この範囲の pH 変化は FRET 効率にはほとんど影響しないと考えられる。次にオリゴマイシン A で処理した膵島に 20 mM のメチルピルビン酸刺激を行い、 $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  を同時イメージングした。すると、3~4 分間のオリゴマイシン A 刺激の後メチルピルビン酸刺激をしても、 $[ATP]_c$  の増加は見られなかった。一方  $[Ca^{2+}]_c$  については  $[ATP]_c$  の減少と並行してレシオ比(fura-2S/fura-2L)で 1 から 1.5 まで徐々に上がったが、メチルピルビン酸刺激後の急速な増加は見られなかった(Fig. 11 C)。 $[Ca^{2+}]_c$  が微増した理由は、おそらく  $[ATP]_c$  が減少することで ATP を用いて  $Ca^{2+}$  をくみ出す小胞体や細胞膜に存在する  $Ca^{2+}$  ポンプの働きが抑えられた結果ではないかと考えられる。これら結果は、メチルピルビン酸がミトコンドリアでの ATP 合成を活性化させることで  $Ca^{2+}$  の流入を誘導していることを強く示唆している。

### 単離膵島におけるグルタミン/ロイシン刺激時の $[ATP]_c$ 、 $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動

ミトコンドリア内の酵素であるグルタミン酸脱水素酵素(GDH)がインスリン分泌に関与していると報告されている。高インスリン症を発症する患者の中には GDH に変異があり、正常な場合と比べてその活性が高いことが知られている(29)。また、GDH の欠失によりインスリン分泌が一部抑制されることも明らかにされている(30)。GDH は  $glutamate + NAD(P)^+ \longleftrightarrow \alpha\text{-ketoglutarate} + NH_4^+ + NAD(P)H$  の反応を触媒するが、GDH をアロステリックに活性化させるロイシンが $\beta$ 細胞のインスリン分泌を誘導することがこれまでの研究で明らかにされている(31、32)。そこで私は、ロイシンが GDH を活性化させることで、ミトコンドリアでの ATP 合成を促進して  $Ca^{2+}$  の流入を引き起こしていると考え、ロイシン刺激を行った際の細胞内 ATP 濃度と  $Ca^{2+}$  濃度の変化を観

察した。するとロイシンのみの刺激では $[ATP]_m$ は増加したが、 $[ATP]_c$ には大きな変化が見られず、 $[Ca^{2+}]_c$ の増加も見られなかった(Fig. 12 A および B)。またグルタミン単独刺激も行ったが、 $[ATP]_m$ 、 $[ATP]_c$ や $[Ca^{2+}]_c$ に大きな変化は見られなかった(Fig. 12 C および D)。そこで 10 mM のグルタミンを含む KRH 培地で膵島を 20 分間前培養した後に 10 mM のロイシン刺激を行った。するとロイシン刺激により $[ATP]_m$ や $[ATP]_c$ の増加に続いて、 $[Ca^{2+}]_c$ の急速な増加が観察された(Fig. 12 E および F)。10 mM のグルタミンを含む培地で膵島を 20 分間前培養してその後オリゴマイシン A で 3~5 分間処理すると、10 mM のロイシン刺激をしても  $[ATP]_c$ の増加は見られなかった。一方  $[Ca^{2+}]_c$ については $[ATP]_c$ の減少と並行してレシオ比(fura-2S/fura-2L)で 1 から 1.5 まで徐々に上がったが、ロイシン刺激後の急速な増加は見られなかった(Fig. 13)。  $[Ca^{2+}]_c$ が微増した理由は、おそらく $[ATP]_c$ が減少することで ATP を用いて  $Ca^{2+}$ をくみ出す小胞体や細胞膜に存在する  $Ca^{2+}$ ポンプの働きが抑えられた結果ではないかと考えられる。これら結果は、ロイシンが GDH の活性化を介してミトコンドリアでの ATP 合成を促進させ、 $Ca^{2+}$ の流入を誘導したことを強く示唆している。

### 単離膵島における $[ATP]_c$ と $Ca^{2+}$ オシレーション

インスリン分泌において $[Ca^{2+}]_c$ がグルコース刺激後の最初の流入(第 1 相)に続いてオシレーションという特徴的な挙動(第 2 相)を示すことは広く知られている(7)。しかし、この  $Ca^{2+}$ オシレーションがどのようなメカニズムで引き起こされ制御されているのかについては不明な点が多く存在している。これまでは $[ATP]_c$ がオシレーションすることによって  $Ca^{2+}$ オシレーションが引き起こされると考えられてきた。ルシフェラーゼを用いた膵島における ATP イメージング結果によると、高グルコース条件で周期が 133 秒のオシレーションが観察されたのみならず、低グルコース条件でも周期が 67 秒のオシレーションが観察された(33)。しかし Perceval を用いた ATP/ADP 比イメージング結果(16)と同様に、本研究での GO-ATeam1 を用いた ATP イメージングでは低グルコース条件では明確なオシレーションは見られなかった。ルシフェラーゼによる発光は、酸素濃度やアセチル CoA、また基質であるルシフェリン濃度といった様々な因子による影響を受けるので、振動する発光パターンが ATP 以外の因子による可能性を排除できない。そこで私は GO-ATeam1 と fura-2 を用いてグルコース刺激時の単離膵島において $[ATP]_c$ の挙動と  $Ca^{2+}$ オシレーションとを比較した(Fig. 14 A)。 $[ATP]_c$ は 25 mM グルコース刺激の後急速に増加した。一方、 $[Ca^{2+}]_c$ は第 1 相の増加の後しばらくして、周期が 2~5 分のオシレーションを示した。最初の  $Ca^{2+}$ の流入の後、オシレーションが開始されるまでの時間や、オシレーションの周期、振幅は観察した膵島によって異なっていたが、 $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションをしている時に $[ATP]_c$ はいずれの膵島でも明確なオシレーションを示さず、高いレベルで維持されたままであった。 $Ca^{2+}$ オシレーションが観察された膵島において、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ について相互相関解析を行ったが、明確な

相関関係は認められなかった(Fig. 14 B)。 *in vitro* の実験により GO-ATeam1 は 10 秒程度の ATP の濃度変化を検出することができる(21)ので、 $[Ca^{2+}]_c$  のオシレーションの周期がおよそ 2~5 分であることを考慮すると、もし  $[ATP]_c$  が  $Ca^{2+}$  オシレーションと同期するならば観察することができるはずである。また 25 mM グルコース条件からさらにグルコース濃度を 42 mM まで上げた時に FRET 効率もさらに増加した(Fig. 14 C)ことから、25 mM グルコース条件下でも  $[ATP]_c$  は GO-ATeam1 の検出範囲内(2~20 mM)(21)にあると考えられる。さらにグルコース濃度を段階的に上げていった場合でも、 $[ATP]_c$  は徐々に増加するが、 $[Ca^{2+}]_c$  と同期した顕著なオシレーションを示すことはなかった(Fig. 15 A)。

インクレチンホルモン的一种である GLP-1 は小腸の L 細胞より分泌されるホルモンであり(34)、 $\beta$ 細胞の GLP-1 受容体に作用してインスリン分泌を増強することから、近年 2 型糖尿病治療で注目されている(35)。そこで GLP-1 受容体作動薬であるエキセンジン-4 存在下で  $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  の挙動に変化が見られるのかを調べた(Fig. 15 B)。グルコース濃度を段階的に上げると、エキセンジン-4 非存在下での場合と同様に 8.3 mM の時に最初の  $[Ca^{2+}]_c$  の増加が見られた。さらにグルコース濃度を上げていくと、 $Ca^{2+}$  オシレーションが見られたが、その周期はエキセンジン-4 非存在下の場合は  $140 \pm 40$  (mean  $\pm$  S.D.)秒であったのに対して、エキセンジン-4 存在下では  $60 \pm 20$  (mean  $\pm$  S.D.)秒であった。インスリン分泌は  $[Ca^{2+}]_c$  の挙動と同期して行われる(7)ことが分かっているので、この周期の短い  $Ca^{2+}$  オシレーションはインスリン分泌増強効果を表していると考えられる。また  $[ATP]_c$  はエキセンジン-4 存在下でグルコース濃度が上がると増加したが、 $Ca^{2+}$  オシレーションが観察されている時に顕著なオシレーションを示さなかった。

このように  $[ATP]_c$  は  $[Ca^{2+}]_c$  がオシレーションしている時でも明確なオシレーションはせずにむしろ高濃度で維持されることが分かった。そこで私は次に、高濃度で維持された  $[ATP]_c$  が  $Ca^{2+}$  オシレーションに必要などうかを検証した。高グルコース条件で脱共役剤である 4  $\mu$ M CCCP によりミトコンドリアでの ATP の合成を阻害すると、 $Ca^{2+}$  オシレーションがすぐに停止した(Fig. 16 A)。またグルコース濃度を 25 mM から 2.8 mM に低下させることでミトコンドリアでの ATP 合成を抑制すると、この場合も  $Ca^{2+}$  オシレーションは停止した(Fig. 16 B)。どちらの場合でも  $[ATP]_c$  が下がり始めるとすぐに  $Ca^{2+}$  オシレーションが停止した。これら結果から、 $[ATP]_c$  がオシレーションすることよりもむしろ高いレベルで維持されていることがグルコースによって引き起こされる  $Ca^{2+}$  オシレーションの持続に必要であると考えられる。

さらにヒト膵島を用いた実験で、細胞外グルコース濃度がある閾値を超える(>~6 mM グルコース)と  $Ca^{2+}$  オシレーションが見られ、インスリンが分泌されることが分かっており、この閾値以上でグルコース濃度を段階的に上げていくと、グルコース濃度に依存してインスリン分泌が見られることも明らかになっている(36)。そこで私は、閾値以上のグルコース濃度で  $Ca^{2+}$  オシレーションがグルコース濃度に応じてどのように制

御されているのかを検討した(Fig. 16 C)。初めに 11 mM グルコースの条件で、 $[Ca^{2+}]_c$  がオシレーションしている時に、グルコース濃度を 25 mM まで上げた。すると  $[ATP]_c$  の増加とともに、 $[Ca^{2+}]_c$  のオシレーションも維持されていた。その後再び 11 mM グルコース条件に戻すと、 $[ATP]_c$  が低下している時は  $[Ca^{2+}]_c$  のオシレーションが見られなくなり、 $[ATP]_c$  が一定になるとしばらくしてオシレーションが再開された。これら結果をまとめたものが Fig. 16 D である。細胞外グルコース濃度が閾値以下ならば、 $Ca^{2+}$  オシレーションはどのような状況でも起きない。細胞外グルコース濃度が閾値以上になり、 $[ATP]_c$  が増加、あるいは一定となる条件では  $Ca^{2+}$  オシレーションが見られるが、 $[ATP]_c$  が一定になるまで減少している間は細胞外グルコース濃度が閾値以上であっても  $Ca^{2+}$  オシレーションは見られない。これら結果は、 $\beta$ 細胞が  $[ATP]_c$  の変化から細胞外グルコース濃度の変化を感じ取り、インスリン分泌を制御していることを示唆している。

### **$K_{ATP}$ チャンネルと $Ca^{2+}$ オシレーション**

Fig. 16 で、細胞外グルコース濃度が低下し  $[ATP]_c$  が一定になるまで減少している間はグルコースの絶対濃度に関わらず  $Ca^{2+}$  オシレーションが見られなくなることを示した。ATP は  $K_{ATP}$  チャンネルに結合することでチャンネル活性をブロックすることが知られているので、 $[ATP]_c$  の減少に伴う  $Ca^{2+}$  オシレーションの一過的な停止が  $K_{ATP}$  チャンネルの調節によるものではないかと考えた。 $K_{ATP}$  チャンネルブロッカーであるトルブタミドは  $\beta$ 細胞において  $Ca^{2+}$  オシレーションを誘導することが知られている(37)。そこで単離膵島に対してトルブタミド処理を行い、 $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  をモニターした(Fig. 17)。初めに 100  $\mu$ M のトルブタミド条件で  $[Ca^{2+}]_c$  をオシレーションさせた。 $Ca^{2+}$  オシレーション時に  $[ATP]_c$  は、 $[Ca^{2+}]_c$  と逆相関の関係にあった。具体的には  $[Ca^{2+}]_c$  が増加すると  $[ATP]_c$  は減少し、 $[Ca^{2+}]_c$  が減少すると  $[ATP]_c$  は増加した。これは  $Ca^{2+}$  の流入に伴う ATP 消費を示唆していると考えられる。その後トルブタミド濃度を 500  $\mu$ M にすると  $[Ca^{2+}]_c$  が増加したのと同時に  $[ATP]_c$  が減少した。グルコース刺激の場合はグルコース濃度を上げても  $Ca^{2+}$  オシレーションは観察され続けていたのに対して、トルブタミド刺激の場合、500  $\mu$ M では  $Ca^{2+}$  濃度は高レベルで維持されていた。ATP とスルホニルウレアであるトルブタミドはスルホニル受容体のそれぞれ異なる場所に結合することが分かっているので、この相互作用部位の違いによって  $[Ca^{2+}]_c$  のダイナミクスのパターンが異なっているのかもしれない。その後トルブタミドの濃度を 100  $\mu$ M に戻すと、 $[Ca^{2+}]_c$  は減少し比較的低レベルで維持されしばらくして  $Ca^{2+}$  オシレーションが再開した。この結果は、 $K_{ATP}$  チャンネルがリガンドの絶対濃度のみならずその変化によっても制御され  $Ca^{2+}$  オシレーションの有無を決めていることを示唆している。



## 考察

### ATP と第 1 相の $Ca^{2+}$ の流入との関係

本研究で私は、GO-ATeam1 と fura-2 を用いることで単一のマウス膵島において細胞内 ATP 濃度と細胞質  $Ca^{2+}$  濃度の同時イメージングを行った。その結果、グルコース、メチルピルビン酸、あるいはグルタミン/ロイシン刺激により  $[ATP]_m$  や  $[ATP]_c$  の急速な増加に続いて  $[Ca^{2+}]_c$  の急速な増加が見られることを明らかにした (Fig. 9、11 A および B、12 E および F)。これらの結果は、グルコースによって誘導される ATP/ADP 比の増加が細胞膜の脱分極や  $[Ca^{2+}]_c$  の増加より先に起こるという過去の報告(16)とも一致している。さらに阻害剤を用いてミトコンドリアのエネルギー代謝をブロックすると、グルコース、メチルピルビン酸、あるいはグルタミン/ロイシン刺激を行っても  $[ATP]_c$  と  $[Ca^{2+}]_c$  の増加が見られなくなった (Fig. 10 A および C、11 C、13) ことから、エネルギー源が何であれ、ミトコンドリアでの代謝の活性化によって引き起こされる  $[ATP]_c$  の増加が第 1 相の  $Ca^{2+}$  の流入に必要であることを強く示唆している。

### ATP と第 2 相の $Ca^{2+}$ オシレーションとの関係

第 2 相の  $Ca^{2+}$  オシレーションは膵島あるいは  $\beta$  細胞で見られる典型的な特徴であり、インスリン分泌に必要であると考えられている (7、8、9)。Kir6.2-/-マウスの膵島に対してグルコースあるいはトルブタミドで刺激を行っても、 $[Ca^{2+}]_c$  濃度はオシレーションせずに常に高い状態であった (6) ことから、 $K_{ATP}$  チャネル活性がオシレーションすることが  $Ca^{2+}$  オシレーションに必要であると考えられる。このことから、 $K_{ATP}$  チャネルに結合してその活性を阻害する ATP の細胞内濃度がオシレーションすることで  $Ca^{2+}$  オシレーションが引き起こされると考えられてきた。また  $Ca^{2+}$  オシレーションはグルコースのみならず、ミトコンドリアでのエネルギー基質となるメチルピルビン酸 (38) やグルタミン/ロイシン (39)、 $\alpha$  ケトイソカプロン酸 (38、40) 刺激でも観察されることがこれまでの研究で明らかになっていることから、 $Ca^{2+}$  オシレーションにおける ATP の役割は非常に大きいと考えられる。しかし本研究結果では、マウスより単離した膵島において  $[ATP]_c$  の明確なオシレーションは観察されなかった (Fig. 14 A および B)。私は、25 mM のグルコース条件で  $Ca^{2+}$  オシレーションが観察されている時でも  $[ATP]_c$  は GO-ATeam1 の計測範囲内 (2~20 mM) (21) にあることを示した (Fig. 14 C)。また、GO-ATeam1 がインスリン分泌細胞において ATP の 1 mM 程度の濃度変化であるならば検知できるバイオセンサーであることも確認した (Fig. 3 B)。さらに GO-ATeam1 は 10 秒程度の ATP の濃度変化も検出することができる (21) のに対して観察された  $Ca^{2+}$

オシレーションの周期は2～5分であった。従って、もし $[ATP]_c$ がオシレーションするならばそれは $\mu M$ レベルの非常に微小なものであると考えられる。これとは逆に近年、グルコース刺激による細胞膜直下(sub-plasma membrane)の $Ca^{2+}$ 濃度( $[Ca^{2+}]_{pm}$ )のオシレーション時に細胞膜直下のATP濃度( $[ATP]_{pm}$ )もオシレーションするという報告がなされた(17)。しかし、この微小環境における $[ATP]_{pm}$ のオシレーションは $Ca^{2+}$ の流入に伴うATP消費が局所的に強められたことによると推測される。なぜなら細胞膜直下の $Ca^{2+}$ オシレーションと $[ATP]_{pm}$ のオシレーションを比較すると、 $[Ca^{2+}]_{pm}$ が増加するとそれに続いて $[ATP]_{pm}$ が低下し、 $[Ca^{2+}]_{pm}$ が低下するとそれに続いて $[ATP]_{pm}$ が増加するからである。一方、エネルギー代謝の活性化によりミトコンドリアから多くのATPが細胞質に供給されることを考えると、 $\beta$ 細胞の細胞質全体のATP濃度が $Ca^{2+}$ オシレーション時や $[ATP]_{pm}$ のオシレーション時にほとんど一定に保たれていても何ら不思議ではない。

ミトコンドリアでのATP合成を阻害、あるいはグルコース濃度を下げて抑制すると、 $[ATP]_c$ が下がり始めるのとほぼ同時に $Ca^{2+}$ オシレーションが見られなくなった(Fig. 16 A および B)。これら結果より、 $[ATP]_c$ がオシレーションすることよりもむしろ、高いレベルで維持されていることが $Ca^{2+}$ オシレーションに必要であると考えられる。またグルコース濃度を $Ca^{2+}$ オシレーションが見られる閾値以上(>6 mM グルコース)の範囲で下げた時でも、 $[ATP]_c$ が下がり始めるのとほぼ同時に $Ca^{2+}$ オシレーションは見られなくなり、 $[ATP]_c$ が一定になりしばらくすると $Ca^{2+}$ オシレーションが再開した(Fig. 16 C)。この結果も、 $[ATP]_c$ が高いレベルで維持されることが $Ca^{2+}$ オシレーションに必要であるという考えを支持している。これら結果は、 $\beta$ 細胞が $[ATP]_c$ のわずかな低下を感知することでエネルギー供給の小さな低下を感知できることを示唆している。これは生体内で血糖値が低下しすぎることなく維持されるのに必要なシステムであると考えられる。もし $[ATP]_c$ が完全に下がることが $Ca^{2+}$ のオシレーションの停止に必要であるならば、その結果、多量のインスリンが低グルコース状態でも分泌され続けることになり、重篤な低血糖を引き起こしかねない。このような事態を避けるために $\beta$ 細胞は $[ATP]_c$ のわずかな低下を感知してインスリン分泌を制御できる仕組みを備えていると考えられる。

### **$K_{ATP}$ チャネルの制御と $Ca^{2+}$ オシレーション**

ATPの絶対濃度のみならずその濃度変化によっても $Ca^{2+}$ オシレーションが制御される可能性が示唆された。さらに $K_{ATP}$ チャネルのブロッカーであるトルブタミドを用いた場合でも、トルブタミド濃度を下げると $Ca^{2+}$ オシレーションが一時的に停止した(Fig. 17)ことから、グルコース濃度あるいはリガンド濃度の変化を認識するのに $K_{ATP}$ チャネルが重要な役割を果たしていると考えられる。また $K_{ATP}$ チャネルを構成するスルホニルウレア受容体をノックアウトしたSUR1<sup>-/-</sup>マウスの膵島では、グルコース濃度を下げ

た時でもインスリン分泌がすぐに止まらずしばらく続いたことが報告されており(41)、グルコース濃度変化時における  $K_{ATP}$  チャンネルの制御の重要性を示唆している。それではどのような機構で  $K_{ATP}$  チャンネルはリガンド濃度の変化に対応して制御されているのだろうか。私は、 $K_{ATP}$  チャンネルがリガンド濃度変化に対して非常に感度よく制御されるようになるように設計されているのではないかと考えている。そこで私は  $K_{ATP}$  チャンネルがオシレーション状態と安定状態という 2 つの状態をとり、リガンド濃度とその変化に応じていずれかの状態になることで、 $Ca^{2+}$ オシレーションの有無を決定していると想定した(Fig. 18)。グルコース濃度が低い時、 $K_{ATP}$  チャンネルは安定状態にある。グルコース濃度が上がり閾値を超えると  $K_{ATP}$  チャンネルは安定状態からオシレーション状態に移行し  $Ca^{2+}$ オシレーションが生じる。さらにグルコース濃度が上がると細胞質 ATP 濃度変化( $\Delta [ATP]_c$ )が 0 以上となり  $K_{ATP}$  チャンネルはオシレーション状態を維持している。やがてグルコース濃度が下がりだすと  $\Delta [ATP]_c$  が負となり  $K_{ATP}$  チャンネルはすぐにオシレーション状態から安定状態へと移行し、 $Ca^{2+}$ オシレーションも停止する。

本研究結果から私は、ATP が  $Ca^{2+}$ と共にオシレーションする因子ではなくて、 $K_{ATP}$  チャンネルの 2 つの状態(オシレーション状態と安定状態)の切り替えにおいて重要な役割を担い、 $Ca^{2+}$ オシレーションの有無を決定する機能を果たしているのではないかと推測している(Fig. 18)。

### ATP と $K_{ATP}$ チャンネルの制御

これまでの研究で  $K_{ATP}$  チャンネルには 2 つのヌクレオチド結合ドメインがあり、ATP や ADP が結合/解離することでチャンネル活性が変化することが知られている(2)。本研究でグルコース刺激によって、GO-ATeam1 の FRET 効率の変化が観察されたことから、 $\beta$ 細胞内の ATP 濃度は GO-ATeam1 の計測範囲内(2~20 mM)(21)にあると推測される。一方  $Mg^{2+}$ 非結合型 ATP に対する  $K_{ATP}$  チャンネルの  $K_i$  値はおよそ 10  $\mu$ M であることがこれまでの研究から明らかにされている(3、42)ので、一見すると mM レベルの ATP の変化が  $K_{ATP}$  チャンネルを制御することはできないように思える。しかし、実際の細胞内では  $Mg^{2+}$ 非結合型 ATP はほとんど存在せず、大部分の ATP は  $Mg^{2+}$ と結合した形で存在する(43)。また  $K_{ATP}$  チャンネルに存在する 2 つのヌクレオチド結合ドメインは、1 つがチャンネルの阻害、もう 1 つがチャンネルの活性化に関わる(44、45)ことが報告されている。さらに、これら 2 つの効果のうちチャンネルの活性化には  $Mg^{2+}$ が必要であることが分かっている(45)。  $Mg^{2+}$ 結合型 ADP が  $K_{ATP}$  チャンネルと ATP との相互作用を弱める(46)という報告もあることから、生理学的条件下での  $K_{ATP}$  チャンネルは、ATP あるいは  $Mg^{2+}$ 結合型 ATP や  $Mg^{2+}$ 結合型 ADP との相互作用によってもたらされる阻害効果と活性効果のバランスによって複雑に制御されているのかもしれない。本研究で使用した ATP バイオセンサーである GO-ATeam は  $Mg^{2+}$ 結合型と非結合型のいずれの ATP とも結合できる。ヌクレオチドによる  $K_{ATP}$  チャンネルのこうした複雑な制御メカニズムを知

するためにはMg<sup>2+</sup>結合型と非結合型ATPを見分けることのできるバイオセンサーの開発も今後必要ではないかと考えられる。さらにエネルギー代謝を変化させるとATP濃度だけでなく、ADP濃度も変化することから、細胞内ADP濃度のダイナミクスを知ることにも必要になってくるのではないかと思う。

### 本研究のまとめと今後の展望

本研究で、グルコース、メチルピルビン酸、あるいはグルタミン/ロイシン刺激によって引き起こされる[ATP]<sub>m</sub>と[ATP]<sub>c</sub>の増加が第1相のCa<sup>2+</sup>の流入に必要であること、また[ATP]<sub>c</sub>がオシレーションではなく高濃度で維持されることがグルコース刺激によって引き起こされる第2相のCa<sup>2+</sup>オシレーションに必要であることが明らかにされた。さらに高グルコース条件でのCa<sup>2+</sup>オシレーションの有無が、[ATP]<sub>c</sub>の絶対値のみならずその変化によっても決定されうることが分かった。これら結果は部分的かもしれないが、我々ヒトにおいて食事やグルコースの摂取による血糖値の上昇がどのようにインスリン分泌を促し、その結果として生じる血糖値の低下がどのようにしてインスリン分泌の抑制、停止につながるのかを示している。

一方2型糖尿病ではβ細胞の機能低下が見られ、高グルコース状態でもインスリンの分泌が抑制されていることが多くの先行研究によって明らかにされている(47~52)。特にβ細胞のグルコース取り込みやグルコース代謝の低下、またミトコンドリアでのATP合成の低下が2型糖尿病で見られるインスリン分泌の低下につながっていると考えられる。糖尿病モデルマウス(高脂肪食負荷マウス)のβ細胞ではグルコーストランスポーターの細胞表面での発現が減少して(50)おり、糖尿病患者あるいは糖尿病モデルマウス(ob/obマウス)のβ細胞ではミトコンドリア脱共役タンパク質の1つであるUCP-2の発現が上がり、ミトコンドリア膜電位の分極が抑制され、細胞内ATP量の低下が認められる(48、51)こと、さらに、糖尿病モデルラット(Goto-Kakizakiラット)において活性酸素種(ROS)の産生を抑えると、細胞内ATP量やインスリン分泌が改善される(52)ことが報告されている。本研究で[ATP]<sub>c</sub>の高濃度での維持がインスリン分泌に必要であると考えられるので、糖尿病患者あるいはモデルマウスの膵島では細胞内ATPダイナミクスが正常ではない可能性が考えられる。本研究で使用した単離膵島における細胞内ATP濃度とCa<sup>2+</sup>濃度の同時イメージング技術を用いることで、2型糖尿病におけるβ細胞内ATPダイナミクスの破綻とインスリン分泌との関連性により迫れるのではないかと期待している。

## 実験材料、方法

### 化合物、試薬

トルブタミド、メチルピルビン酸、Carbonylcyanide 3-Chlorophenylhydrazone (CCCP)は和光純薬より購入した。オリゴマイシン A は Fluka より購入した。Fura-2-AM は同仁化学より購入した。ヨード酢酸、エキセンジン-4 は Sigma より購入した。その他試薬はナカライテスクより購入した。

### MIN6 細胞の培養

MIN6 細胞(53)は 25 mM グルコース、15%牛血清(Sigma)、55  $\mu$ M  $\beta$ -メルカプトエタノール(Gibco)、100 units/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM 培地(Sigma)で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

### マウス膵島単離と初代培養

マウス(C57/BL6J: 7~10 週齢、♂)膵島はコラゲナーゼ(Sigma)注入法により単離した。0.5 mg/ml コラゲナーゼ溶液を総胆管より注入し膵臓を回収し 37°C で 40 分間インキュベートした。その後、2.8 mM グルコースを含む Hanks 溶液で 2 回洗浄し、フィコールを用いた密度濃度勾配遠心法を行い、ハンドピックで膵島を回収した。回収した膵島は 11 mM グルコース、10%牛血清(Cell Culture Bioscience)、100 units/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で 48 時間培養した。

### 細胞膜の透過化

*Staphylococcus aureus* 由来の 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -hemolysin (Sigma)処理(37°C 30 分)により細胞膜の透過化を行った。細胞膜の透過後、細胞内溶液(140 mM KCl、6 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.465 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM EGTA、12.5 mM Hepes (pH7.0))に置換し MgATP を加えて ATP 濃度を変化させた。

### 広視野顕微鏡を用いたイメージング

MIN6 細胞あるいは単離膵島をガラスボトムディッシュ(FPI)の上で培養した。ATP イメージングには、ATeam1.03 あるいは種々の GO-ATeam を発現させるためのアデ

ノウイルスを MIN6 細胞あるいは野生型マウスより単離した膵島細胞に 15 時間感染させ、培地を交換した。その後 1 日間、37℃かつ 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養を行った。ATP バイオセンサーを発現させるためのアデノウイルスは大阪大学大学院医学系研究科の木岡先生よりいただいた。Ca<sup>2+</sup>イメージングには、終濃度が 2-5 μM の fura-2-AM をロードし 30 分間インキュベートした。特段の記載がない限りイメージング前に細胞を、Krebs-Ringer-Hepes (KRH)培地(119 mM NaCl、4.74 mM KCl、1.19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.19 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、2.54 mM CaCl<sub>2</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM Hepes、0.1 % BSA (pH7.4)、2.8 mM glucose)で 40～50 分間培養した。顕微鏡は Ti-E-PFS (Nikon)の倒立顕微鏡を用い、対物レンズは CFI Super Fluor 40x oil: NA 1.30 (Nikon)を使用した。励起フィルター(Semrock)、ダイクロイックミラー、バリアフィルター(Semrock)は以下の組み合わせを使用した。ATeam1.03 を用いたイメージングには、438/24 - DM458 - 483/32 (CFP) もしくは - 542/27 (YFP)を、GO-ATeam を用いたイメージングには、482/18 - DM495 - 520/35 (GFP) もしくは - 579/34 (OFP)を使用した。fura-2 を用いたイメージングには、340/26 (fura-2S) - もしくは 387/11 (fura-2L) - DM400 - 510/84 を使用した。蛍光画像の取得については ORCA-AG cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics)を使用し、10 秒毎で撮影した。顕微鏡システムは NIS-Elements (Nikon)により制御し、イメージングしたデータは MetaMorph (Molecular Devices)を用いて解析を行った。アデノウイルスを用いて ATP バイオセンサーを一過的に発現させた場合、膵島内の個々の細胞で発現量に差が見られるため、膵島全体ではなく、極端にバイオセンサーの発現量が高い部位を除き、ランダムに領域を選び定量を行った。また相互相関解析は 2 つの挙動の畳み込み和を正規化する以下の数式(54)を用いた。またこれを算出するためのプログラムを東北大学多元物質科学研究所の福岡創先生より提供していただいた。

$$Z(\tau) = \frac{\frac{1}{N} \sum_{t=1}^N [x(t) \times y(t+\tau) - \overline{x(t)} \times \overline{y(t)}]}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{t=1}^N [x(t) - \overline{x(t)}]^2} \times \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{t=1}^N [y(t) - \overline{y(t)}]^2}},$$

t は時間、τは時間差、N は画像のフレーム数、Z(τ)は相互相関関数、x(t)は[ATP]<sub>c</sub>の挙動、y(t)は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>の挙動をそれぞれ表す。

## 参考文献

1. Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ammälä, C., Bokvist, K., and Rorsman, P. (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Cell. Biochem.* 55, suppl, 54-65
2. Ashcroft, F. M. (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 115, 2047-2058
3. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P. 4<sup>th</sup>, Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., and Bryan, J. (1995) Reconstitution of  $I_{KATP}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170
4. Inagaki, N., and Seino, S. (1998) ATP-sensitive potassium channels: structures, functions and pathophysiology. *Jpn. J. Physiol.* 48, 397-412
5. Miki, T., Tashiro, F., Iwanaga, T., Nagashima, K., Yoshitomi, H., Aihara, H., Nitta, Y., Gono, T., Inagaki, N., Miyazaki, J., and Seino, S. (1997) Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative  $K_{ATP}$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11969-11973
6. Miki, T., Nagashima, K., Tashiro, F., Kotake, K., Yoshitomi, H., Tamamoto, A., Gono, T., Iwanaga, T., Miyazaki, J., and Seino, S. (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $K_{ATP}$  channel-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10402-10406
7. Gilon, P., Shepherd, R. M., and Henquin, J. C. (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  as evidenced in single pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 268, 22265-22268
8. Gilon, P., and Henquin, J. C. (1992) Influence of membrane potential changes on cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J. Biol. Chem.* 267, 20713-20720
9. Tengholm, A., and Gylfe, E. (2009) Oscillatory control of insulin secretion. *Mol. Cell. Endocrin.* 297, 58-72
10. Hellman, B., Idahl, L. A., and Danielsson, A. (1969) Adenosine triphosphate levels of mammalian pancreatic B cells after stimulation with glucose and hypoglycemic sulfonylureas. *Diabetes* 18, 509-516
11. Ashcroft, S. J., Weerasinghe, L. C., and Randle, P. J. (1973) Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem. J.* 132, 223-231
12. Düfer, M., Krippeit-Drews, P., Buntinas, L., Slemen, D., and Drews, G. (2002)

- Methyl pyruvate stimulates pancreatic  $\beta$ -cells by direct effect on  $K_{ATP}$  channels, and not as a mitochondrial substrate. *Biochem. J.* 368, 817-825
13. Ghosh, A., Ronner, P., Cheong, E., Khalid, P., and Matschinsky, F. M. (1991) The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet  $\beta$ -cells in the isolated perfused rat pancreas. *J. Biol. Chem.* 266, 22887-22892
  14. Lorenz, M. A., El Azzouny, M. A., Kennedy, R. T., and Burant, C. F. (2013) Metabolome response to glucose in the  $\beta$ -cell line INS-1 832/13. *J. Biol. Chem.* 288, 10923-10935
  15. Berg, J., Hung, Y. P., and Yellen, G. (2009) A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat. Meth.* 6, 161-166
  16. Tarasov, A. I., Semplici, F., Ravier, M. A., Bellomo, E. A., Pullen, T. J., Gilon, P., Sekler, I., Rizzuto, R., and Rutter, G. A. (2012) The mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PLoS ONE* 7, e39722
  17. Li, J., Shuai, H. Y., Gylfe, E., and Tengholm, A. (2013) Oscillations of sub-membrane ATP in glucose-stimulated beta cells depend on negative feedback from  $Ca^{2+}$ . *Diabetologia* 56, 1577-1586
  18. Santos, R. M., Rosario, L. M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B., and Valdeolmillos, M. (1991) Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers. Arch.* 418, 417-422
  19. Larsson, O., Kindmark, H., Brändström, R., Fredholm, B., and Berggren, P. O. (1996) Oscillation in  $K_{ATP}$  channel activity promote oscillations in cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration in the pancreatic  $\beta$  cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5161-5165
  20. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15651-15656
  21. Nakano, M., Imamura, H., Nagai, T., and Noji, H. (2011)  $Ca^{2+}$  regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level. *ACS. Chem. Biol.* 6, 709-715
  22. Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010) Unique arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202-1210
  23. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and



- Newgard, C. B. (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49, 424-430
24. Goehring, I., Gerencser, A. A., Schmidt, S., Brand, M. D., Mulder, H., and Nicholls, D. G. (2012) Plasma membrane potential oscillations in insulin secreting Ins-1 823/13 cells do not require glycolysis and are not initiated by fluctuations in mitochondrial bioenergetics. *J. Biol. Chem.* 287, 15706-15717
  25. Lambert, N., Joes, H. C., Idahl, L. A., Ammon, H. P., and Wahl, M. A. (2001) Methyl pyruvate initiates membrane depolarization and insulin release by metabolic factors other than ATP. *Biochem. J.* 354, 345-350
  26. Pullen, T. J., da Silva Xavier, G., Kelsey, G., and Rutter, G. A. (2011) MiR-29a and miR-29b contribute to pancreatic  $\beta$ -cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Mol. Cell. Biol.* 31, 3182-3194
  27. Mertz, R. J., Worley, J. F., Spencer, B., Johnson, J. H., and Dukes, I. D. (1996) Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$ -cells by specific products of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 271, 4838-4845
  28. Zawalich, W. S., and Zawalich, K. C. (1997) Influence of pyruvic acid methyl ester on rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 272, 3527-3531
  29. Stanley, C. A., Lieu, Y. K., Hsu, B. Y., Burlina, A. B., Greenberg, C. R., Hopwood, N. J., Perlman, K., Rich, B. H., Zammarchi, E., and Poncz, M. (1998) Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* 338, 1352-1357
  30. Carobbio, S., Frigerio, F., Rubi, B., Vetterli, L., Bloksgaard, M., Gjinoxci, A., Pournourmohammadi, S., Herrera, P. L., Reith, W., Mandrup, S., and Maechler, P. (2009) Deletion of glutamate dehydrogenase in  $\beta$ -cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 284, 921-929
  31. Li, C., Najafi, H., Daikhin, Y., Nissim, I. B., Collins, H. W., Yudkoff, M., Matschinsky, F. M., and Stanley, C. A. (2003) Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J. Biol. Chem.* 278, 2853-2858
  32. Fahien, L. A., and Macdonald, M. J. (2011) The complex mechanism of glutamate dehydrogenase in insulin secretion. *Diabetes* 60, 2450-2454
  33. Ainscow, E. K., and Rutter, G. A. (2002) Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet  $\beta$ -cells: evidence for a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *Diabetes* 51, S162-S170
  34. Gribble, F. M., Williams, L., Simpson, A. K., and Reimann, F. (2003) A novel

- glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cell line. *Diabetes* 52, 1147-1154
35. Gromada, J., Brock, B., Schmitz, O., and Rorsman, P. (2004) Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95, 252-262
  36. Henquin, J. C., Dufrane, D., and Nenquin, M. (2006) Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55, 3470-3477
  37. Grapengiesser, E., Gylfe, E., and Hellman, B. (1989) Sulfonylurea mimics the effect of glucose in inducing large amplitude oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells. *Mol. Pharmacol.* 37, 461-467
  38. Heart, E., and Smith, P. J. (2007) Rhythm of the  $\beta$ -cell oscillator is not governed by a single regulator: multiple systems contribute to oscillatory behavior. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1295-E1300
  39. Grapengiesser, E., Gylfe, E., and Hellman, B. (1989)  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells exposed to leucine and arginine. *Acta. Physiol. Scand.* 136, 113-119
  40. Martin, F., Sanchez-Andres, J. V., and Soria, B. (1995) Slow  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets. *Diabetes* 44, 300-305
  41. Seghers, V., Nakazaki, M., DeMayo, F., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (2000) *Sur1* knockout mice: a model for  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275, 9270-9277
  42. Gribble, F. M., Tucker, S. J., Haug, T., and Ashcroft, F. M. (1998)  $\text{MgATP}$  activates the  $\beta$ -cell  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7185-7190
  43. Gupta, R. K., and Moore, R. D. (1980)  $^{31}\text{P}$  NMR studies of intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$  in intact frog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 255, 3987-3993
  44. Bokvist, K., Ammälä, C., Ashcroft, F. M., Berggren, P. O., Larsson, O., and Rorsman, P. (1991) Separate processes mediate nucleotide-induced inhibition and stimulation of the ATP-regulated  $\text{K}^+$ -channels in mouse pancreatic beta-cells. *Proc. Biol. Sci.* 243, 139-144
  45. Hopkins, W. F., Fatherazi, S., Peter-Riesch, B., Corkey, B. E., and Cook, D. L. (1992) Two sites for adenine-nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels in mouse pancreatic beta-cells and HIT cells. *J. Membr. Biol.* 129, 287-295
  46. Ueda, K., Inagaki, N., and Seino, S. (1997)  $\text{MgADP}$  antagonism to  $\text{Mg}^{2+}$ -independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J. Biol.*

*Chem.* 272, 22983-22986

47. Pratley, R. E., and Weyer, C. (2001) The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44, 929-945
48. Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A. M., Purrello, F., and Marchetti, P. (2005) Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282-289
49. Maechler, P., and Wollheim, C. B. (2001) Mitochondrial function in normal and diabetic  $\beta$ -cells. *Nature* 414, 807-812
50. Ohtsubo, K., Chen, M. Z., Olefsky, J. M., and Marth, J. D. (2011) Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat. Med.* 17, 1067-1075
51. Yoshihara, E., Fujimoto, S., Inagaki, N., Okawa, K., Masaki, S., Yodoi, J., and Masutani, H. (2010) Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. *Nat. Commun.* 1, 127
52. Sasaki, M., Fujimoto, S., Sato, Y., Nishi, Y., Mukai, E., Yamano, G., Sato, H., Tahara, Y., Ogura, K., Nagashima, K., and Inagaki, N. (2013) Reduction of reactive oxygen species ameliorates metabolism-secretion coupling in islets of diabetic GK rats by suppressing lactate overproduction. *Diabetes* 62, 1996-2003
53. Miyazaki, J., Araki, K., Yamamoto, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990) Establishment of a pancreatic  $\beta$  cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoform. *Endocrinology* 127, 126-132
54. Terasawa, S., Fukuoka, H., Inoue, Y., Sagawa, T., Takahashi, H., and Ishijima, A. (2011) Coordinated reversal of flagellar motors on a single *Escherichia coli* cell. *Biophys. J.* 100, 2193-2200

## 謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

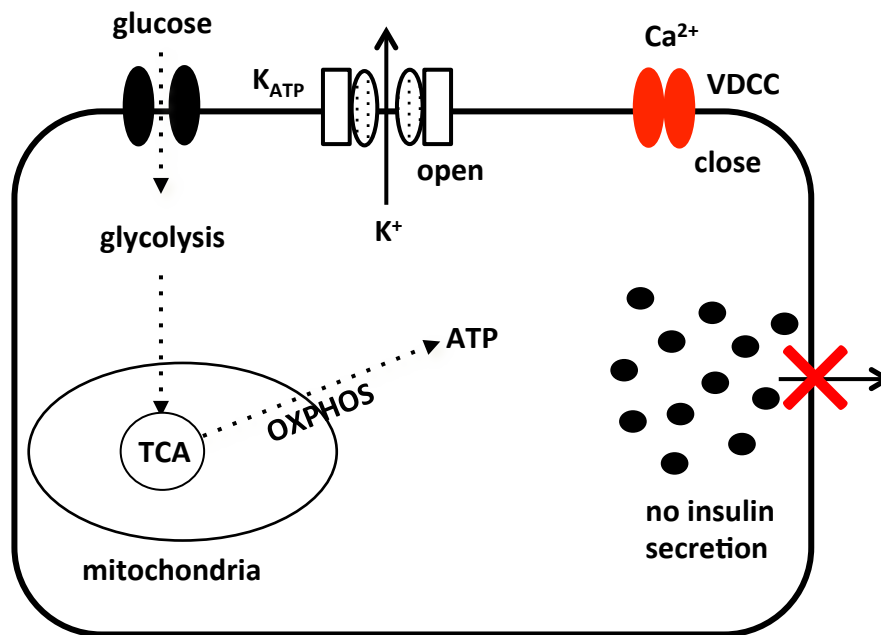
Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, and Imamura H.

Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial  $\text{Ca}^{2+}$  influx and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations.

*Journal of Biological Chemistry*, 289, 2205-2216, 2014

本研究にあたり研究の進め方や論文の書き方について御指導していただきました京都大学大学院生命科学研究科高次生命科学専攻の垣塚彰先生、今村博臣先生に深く感謝いたします。また、膝島単離法の教授やトランスジェニックマウスおよび MIN6 細胞株の提供、さらに議論に至るまで多くのことをサポートしていただきました京都大学大学院医学系研究科糖尿病、栄養内科の稲垣暢也先生、長嶋一昭先生に深くお礼申し上げます。さらに ATP バイオセンサー(ATeam1.03、GO-ATeam)を細胞に発現させるためのアデノウイルスを作製していただきました大阪大学大学院医化学分野の高島成二先生、同循環器内科学分野の木岡秀隆先生に深くお礼申し上げます。また相互相関解析のためのプログラムを提供していただきました東北大学多元物質科学研究所生物分子機能計測研究分野の福岡創先生には深く感謝いたします。最後に、本研究をサポートしていただきました研究室の皆様には心より感謝いたします。

## Low glucose condition



## High glucose condition

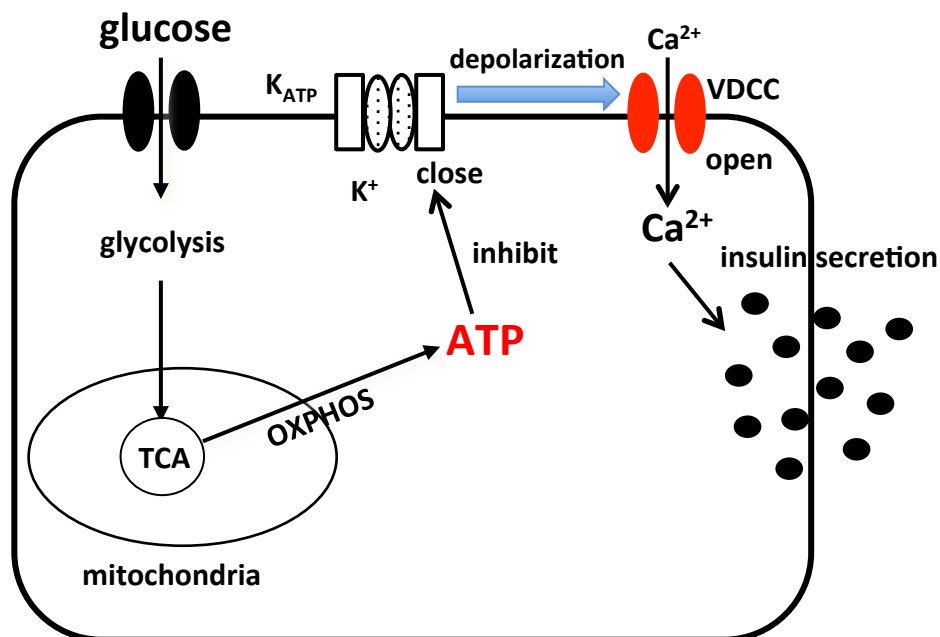
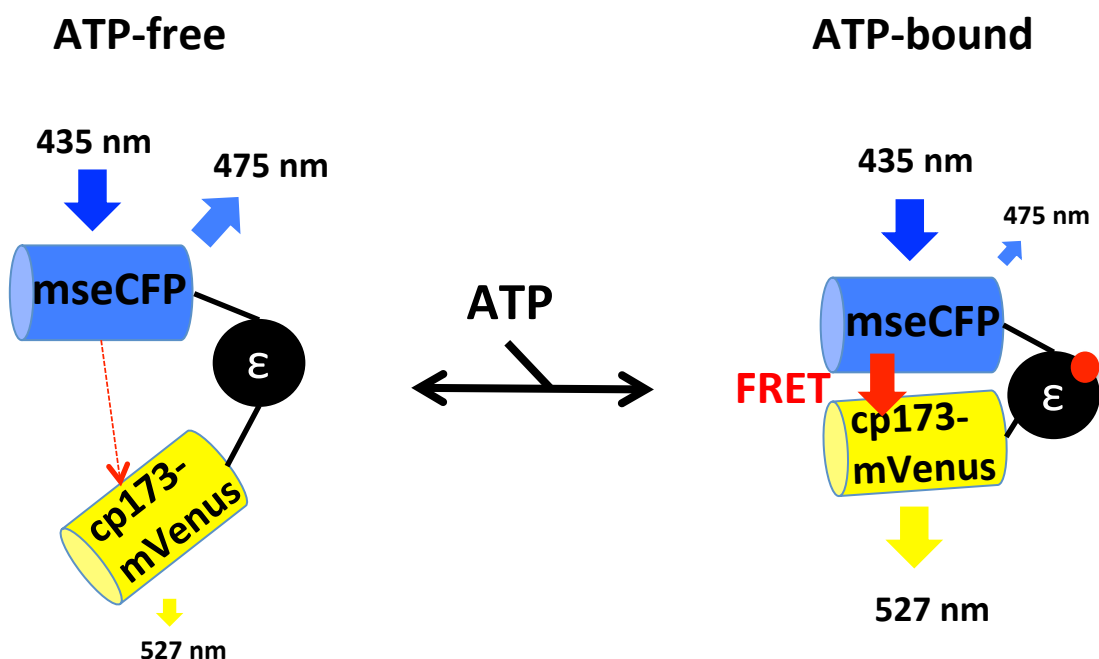


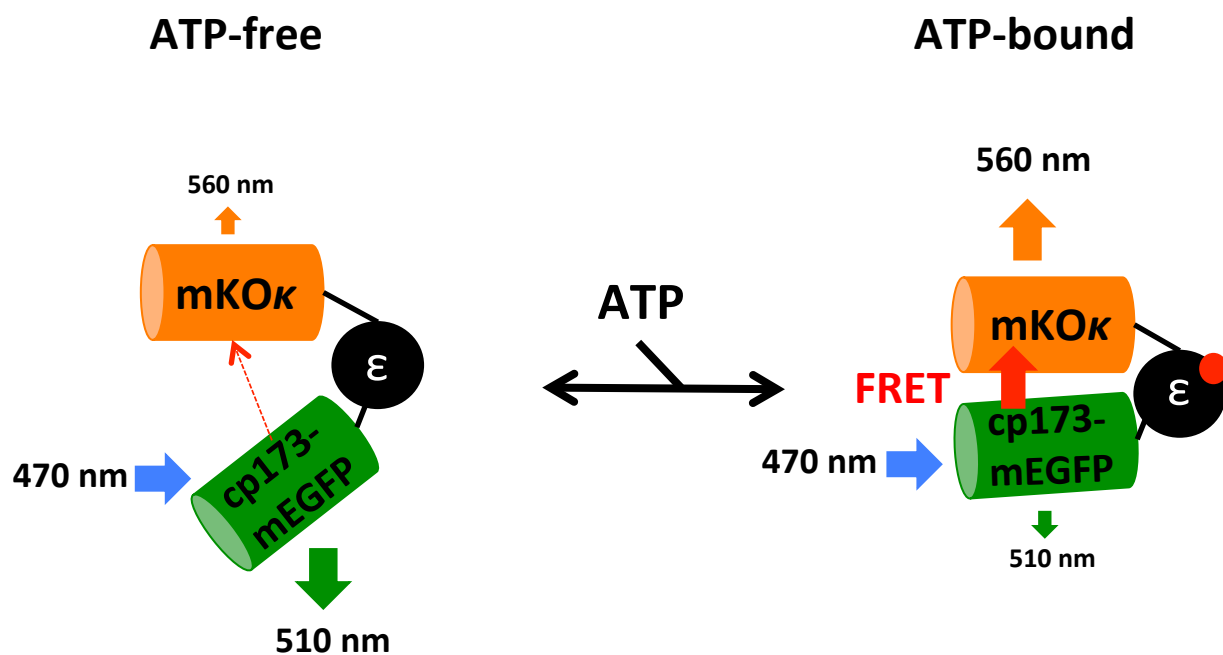
Figure 1. グルコース刺激によるインスリン分泌における代謝説

高グルコース条件では、多くのグルコースが代謝されてATPが合成される。増加したATPが $K_{ATP}$ チャネルを閉じることで、細胞膜の脱分極が生じVDCCが開く。その結果、細胞内に $Ca^{2+}$ が流入し、インスリン分泌が誘導される。OXPHOSは酸化的リン酸化、 $K_{ATP}$ はATP感受性 $K^+$ チャネル、VDCCは電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルを示す。

A

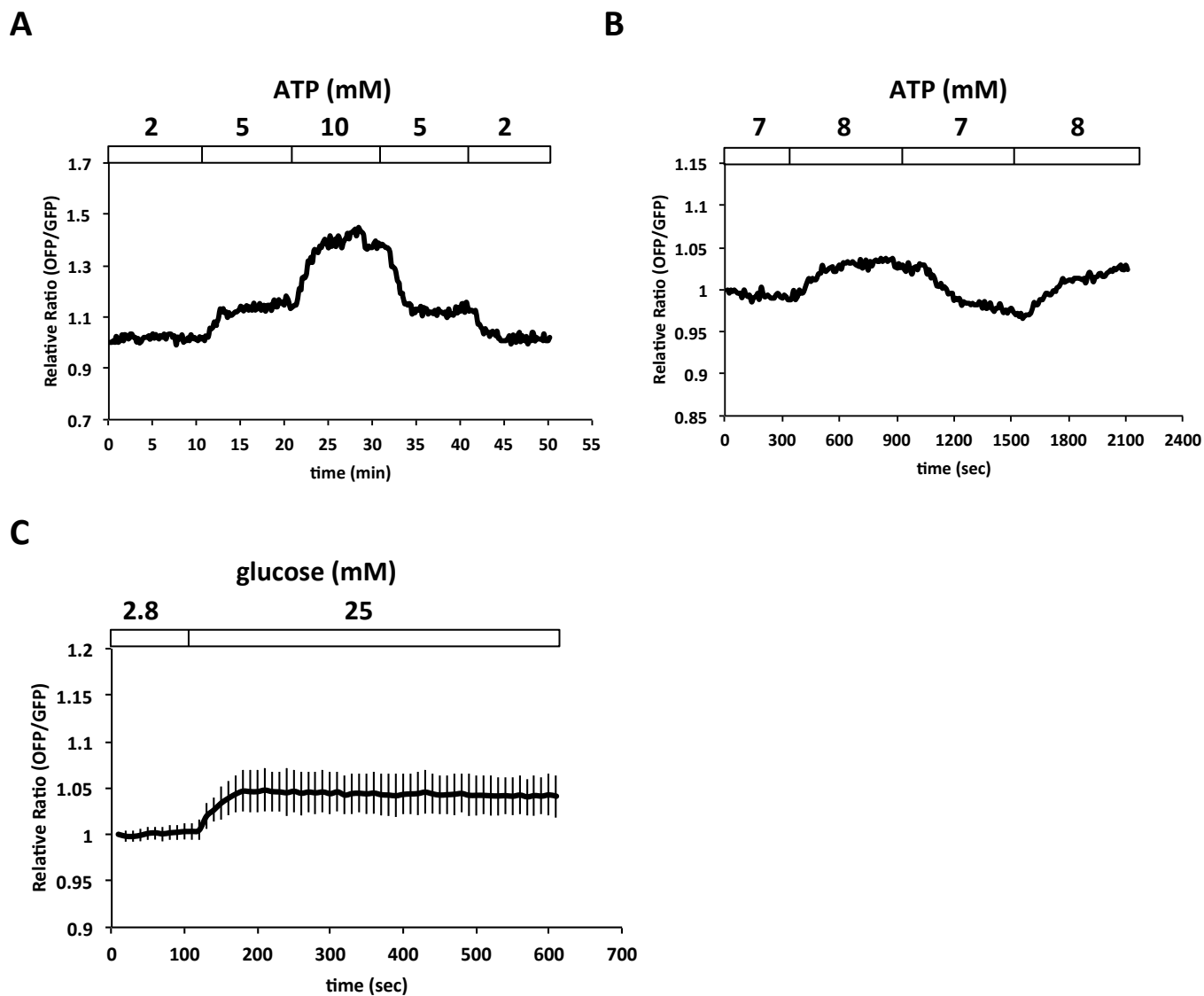


B



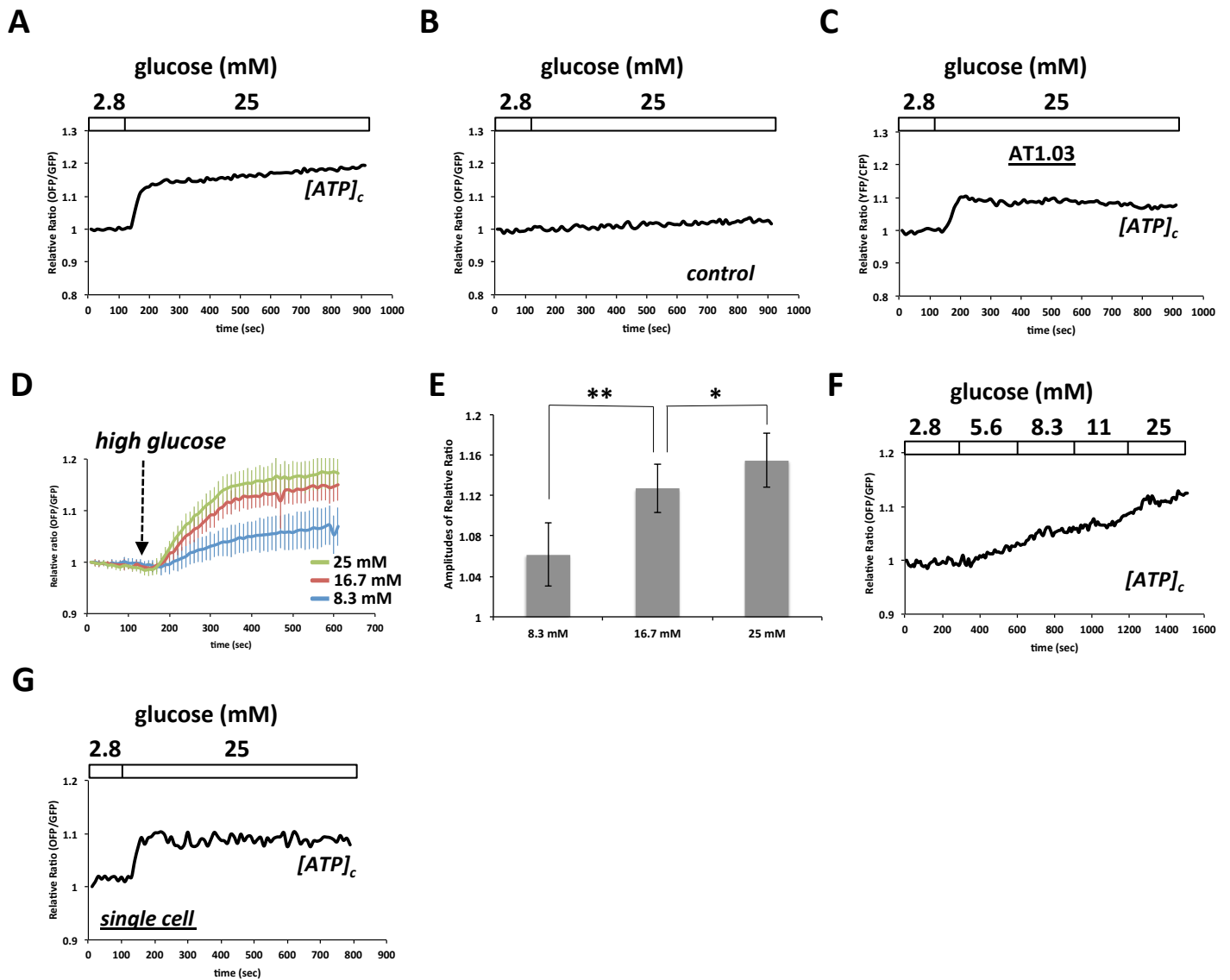
**Figure 2. FRETを用いたATPバイオセンサーの構造と仕組み**

(A) ATeam1.03の構造。CFPのバリエーション(mseCFP)とYFPのバリエーション(cp173-mVenus)を $F_0F_1$ -ATP合成酵素の $\epsilon$ サブユニットのN末とC末にそれぞれ付加した構造をしており、ATPが結合すると2つの蛍光タンパク質の距離が近くなりFRETが起こる。(B) GO-ATeamの構造。OFPのバリエーション(mKOκ)とGFPのバリエーション(cp173-mEGFP)を $F_0F_1$ -ATP合成酵素の $\epsilon$ サブユニットのN末とC末にそれぞれ付加した構造をしており、ATPが結合すると2つの蛍光タンパク質の距離が近くなりFRETが起こる。図中の $\epsilon$ は $F_0F_1$ -ATP合成酵素の $\epsilon$ サブユニットを、赤丸はATPを表す。



### Figure 3. MIN6細胞における $[ATP]_c$ の挙動

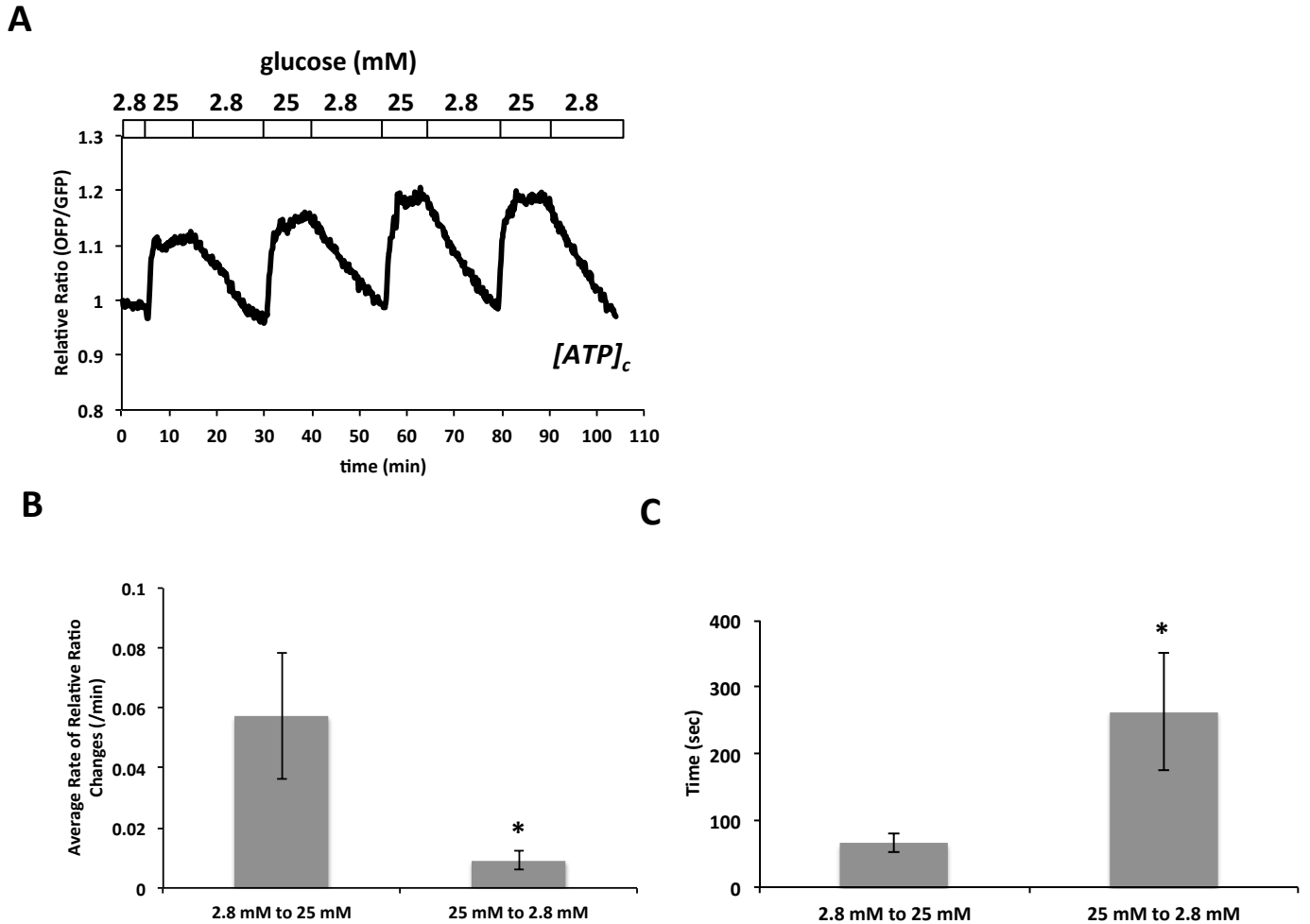
MIN6細胞にGO-ATeam1を発現させた。(A) 細胞膜を透過化したMIN6細胞に対して、MgATPの濃度を変えて、OFP/GFPレシオをモニターした( $n=9$ )。(B) 細胞膜を透過化したMIN6細胞に対して、MgATPの濃度を7 mMと8 mMで交互に変えて、OFP/GFPレシオをモニターした( $n=10$ )。(C) MIN6細胞に対して、25 mMのグルコース刺激を行い、その時のOFP/GFPレシオをモニターした( $n=22$ )。トレースは平均 $\pm$ S.D.を表している。OFP/GFPレシオに変化が見られなかったものについては除外した。



**Figure 4. グルコース刺激時の単離膵島における $[ATP]_c$ の挙動**

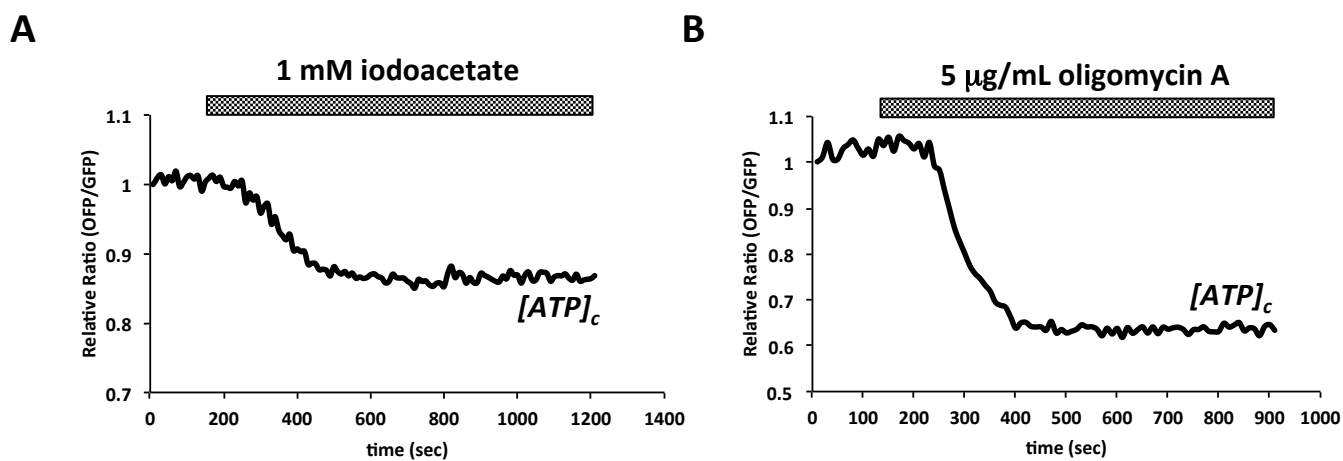
(A, B) マウス単離膵島にGO-ATeamを発現させ、25 mMのグルコース刺激を行った際のOFP/GFPレシオをモニターした。AではGO-ATeam1 (n=13)を、BではGO-ATeam3 (n=4)をそれぞれ膵島に発現させた。(C) 単離膵島にATeam1.03(AT1.03)を発現させ、25 mMのグルコース刺激を行った際のYFP/CFPレシオをモニターした(n=4)。(D) GO-ATeam1を発現した同一の単離膵島に対して、それぞれ8.3、16.7、25 mMのグルコース刺激を行い、その際のOFP/GFPレシオをモニターした(n=10)。トレースは平均±S.D.を表している。(E) Dで示した結果について、グルコース刺激によるOFP/GFPレシオの平均増加率を示した。それぞれの値は平均±S.D.で表しており、t検定の結果、\*は $P<0.05$ 、\*\*は $P<0.0001$ を表している。(F) 単離膵島に対して、グルコース濃度を2.8から25 mMまで徐々に変化させた時のOFP/GFPレシオをモニターした(n=8)。(G) 単離した膵島をトリプシンで単一細胞にして、グルコース刺激を行った際のOFP/GFPレシオをモニターした(n=11)。





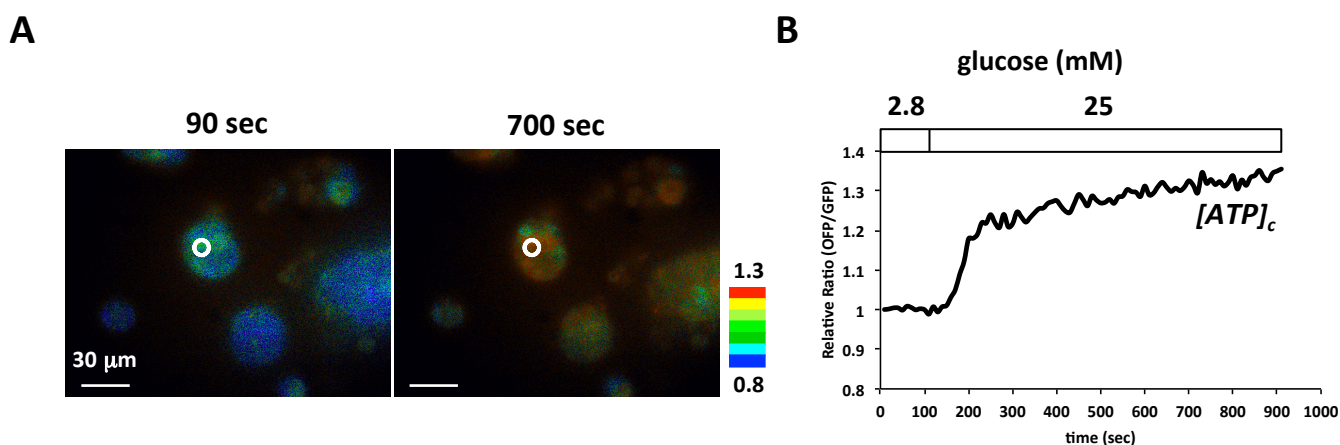
**Figure 5. グルコース濃度低下時の単離膵島における $[ATP]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させた。(A) グルコース濃度を2.8と25 mMの間に交互に上げ下げした時のOFP/GFPレシオをモニターした( $n=9$ )。(B) グルコース濃度を2.8から25 mMに上げた時と、25から2.8 mMに下げた時とで、OFP/GFPレシオの平均変化率を算出した。それぞれ値は平均 $\pm$ S.D.で表しており、t検定の結果、\*は $P<0.0001$ を示す。(C) グルコース濃度を2.8から25 mMに上げた時と、25から2.8 mMに下げた時とで、グルコース濃度を変えてからOFP/GFPレシオが50%変化するまでの時間を算出した。それぞれ値は平均 $\pm$ S.D.で表しており、t検定の結果、\*は $P<0.0001$ を示す。

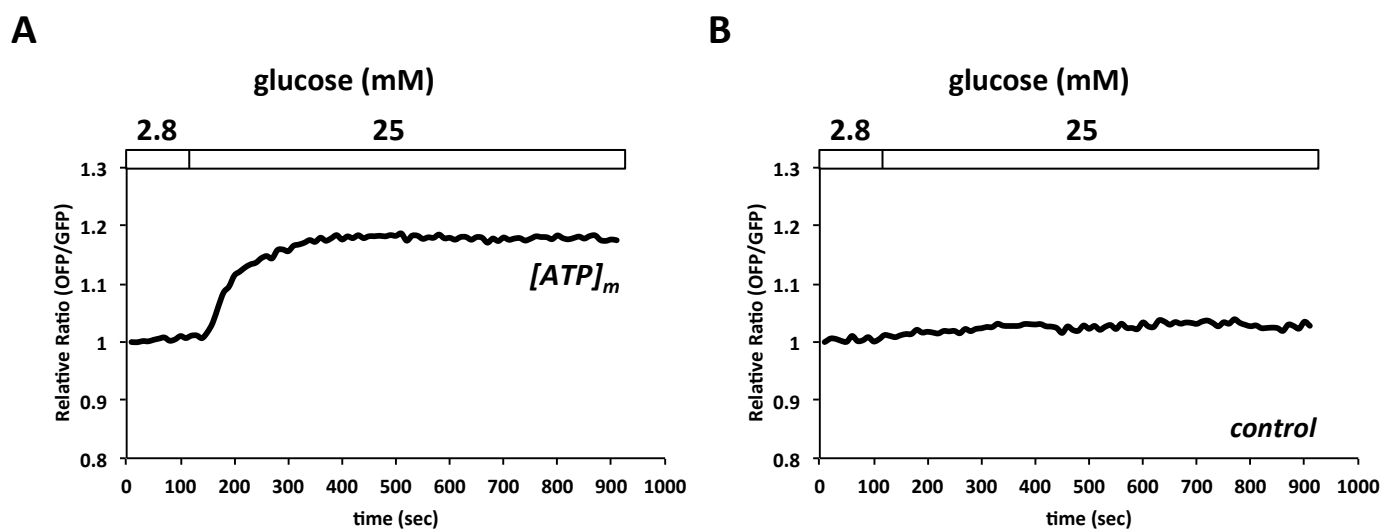


**Figure 6. エネルギー代謝阻害時の単離膵島における $[ATP]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させた。25 mMグルコース条件で膵島を前培養して、1 mMのヨード酢酸(A; n=5)、あるいは5  $\mu$ g/mLのオリゴマイシンA(B; n=5)で刺激した時のOFP/GFPレシオをモニターした。

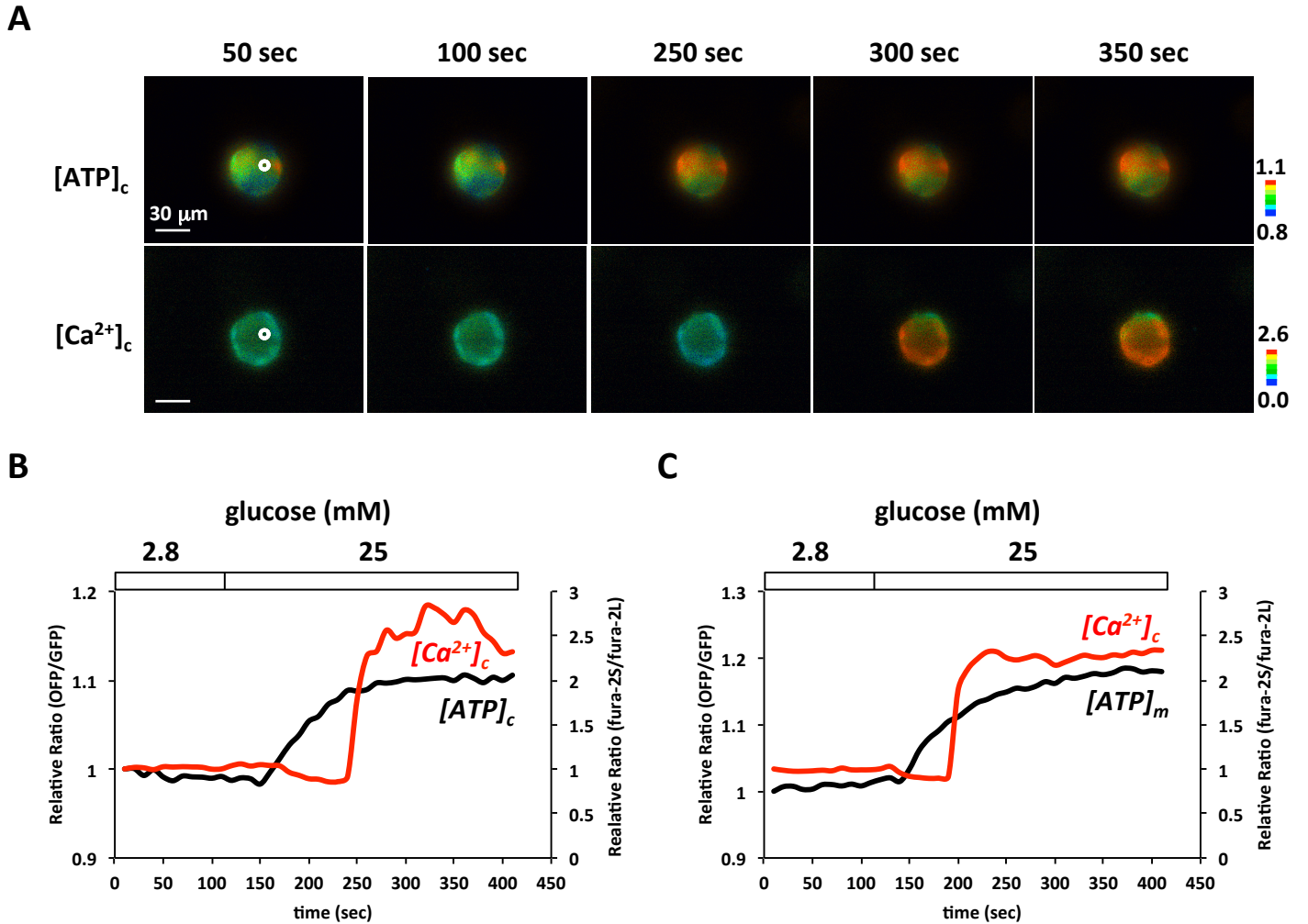


**Figure 7. ラットInsulinプロモーター(RIP)支配下でGO-ATeam1を発現するマウス膵島の[ATP]<sub>c</sub>の挙動**  
 β細胞にGO-ATeam1を発現した膵島に対してグルコース刺激を行い、OFP/GFPレシオをモニターした (n=18)。AはOFP/GFPを擬似色化した画像で、表記された時間はBにおけるタイムコースの時間と一致する。またBのタイムコースはAで示されたROI内を定量化した値である。



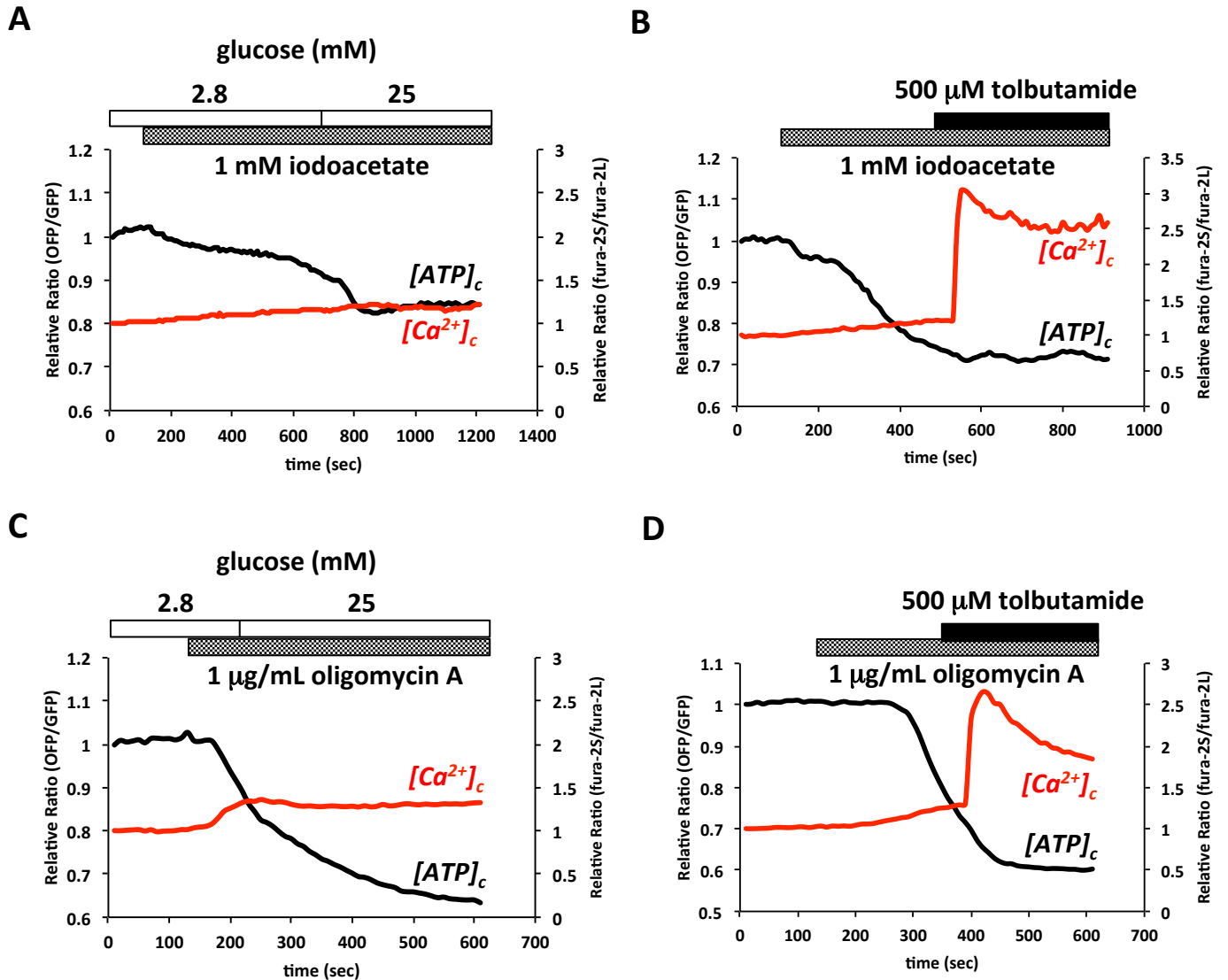
**Figure 8. グルコース刺激時の単離膵島における $[ATP]_m$ の挙動**

(A、B) 単離膵島にmitGO-ATeamを発現させ、25 mMのグルコース刺激を行った際のOFP/GFPレシオをモニターした。AではmitGO-ATeam1 (n=7)を、BではmitGO-ATeam3 (n=4)をそれぞれ膵島に発現させた。

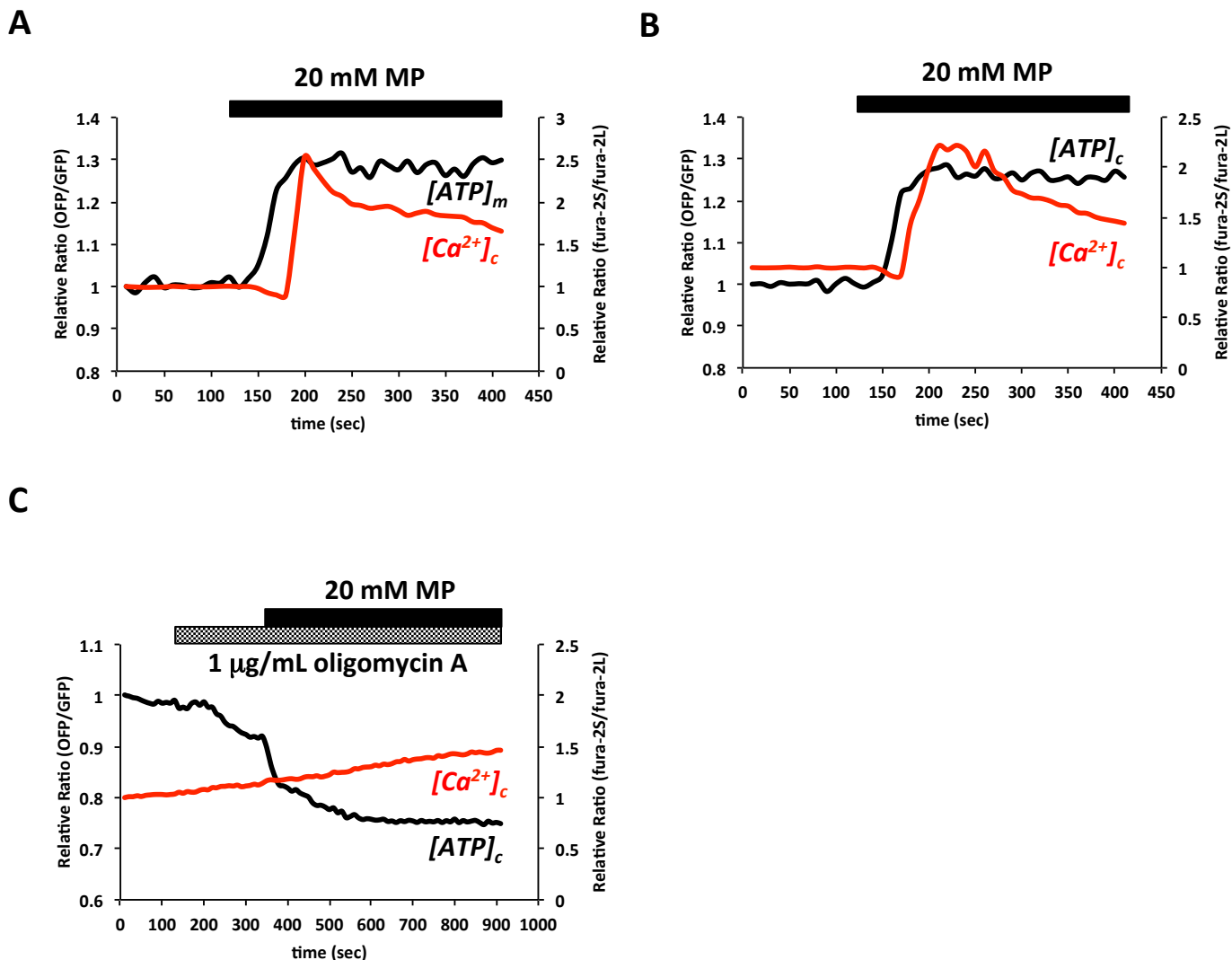


**Figure 9. 単離膵島におけるグルコース刺激時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1(A、B)またはmitGO-ATeam1(C)を発現させ、fura2をロードした。(A、B) 25 mMグルコース刺激を行った際のOFP/GFPレシオ(以下 $[ATP]_c$ )とfura-2S/fura-2Lレシオ(以下 $[Ca^{2+}]_c$ )を同時にモニターした( $n=19$ )。Aは擬似色化したそれぞれのレシオ画像で、表記された時間はBにおけるタイムコースの時間と一致する。またBはAで示したROIを定量化した値である。(C) 25 mMグルコース刺激を行った際の $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動を示している( $n=7$ )。黒線は $[ATP]_c$  (B)もしくは $[ATP]_m$  (C)を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。

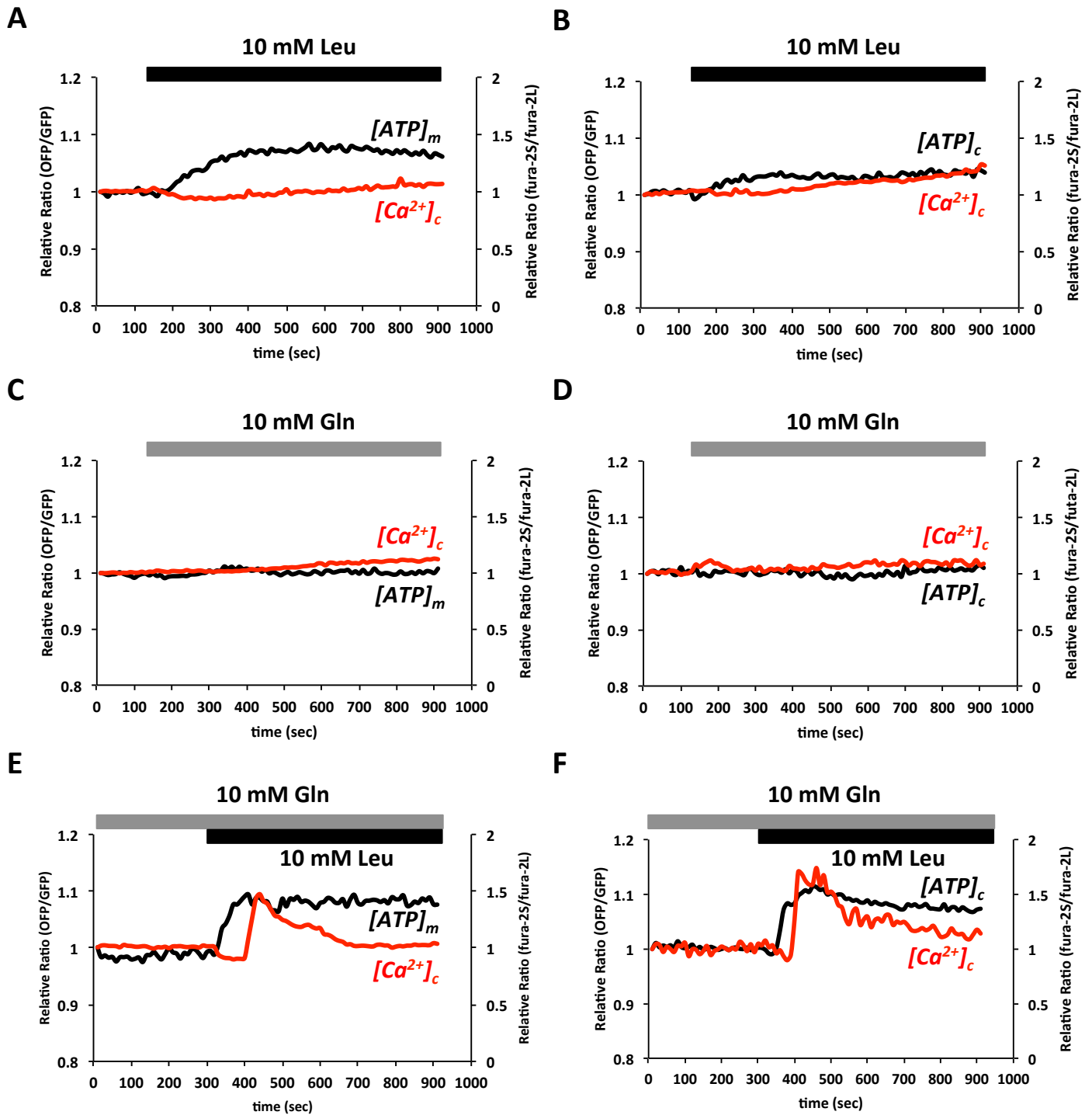


**Figure 10.** エネルギー代謝阻害剤存在下の単離膵島におけるグルコース刺激時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動  
単離膵島にGO-ATeam1を発現させ、fura2をロードした。(A、B) 1 mMヨード酢酸で膵島を処理した後、グルコース刺激(A; n=6)、あるいはトルブタミド刺激(B; n=6)を行った際の、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ をモニターした。(C、D) 1 μg/mLオリゴマイシンAで膵島を処理した後、グルコース刺激(C; n=6)、あるいはトルブタミド刺激(D; n=6)を行った際の、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ をモニターした。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



**Figure 11. 単離臍島におけるメチルピルビン酸刺激時の $[ATP]_c$ 、 $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

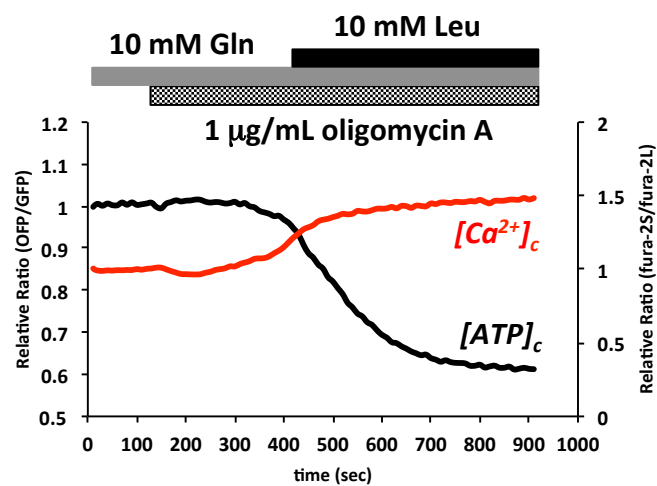
単離臍島にGO-ATeam1(B, C)またはmitGO-ATeam1(A)を発現させ、fura2をロードした。(A, B) グルコースを除いた条件で20 mMのメチルピルビン酸(MP)刺激を行った際の、 $[ATP]_m$  (A; n=5)あるいは $[ATP]_c$  (B; n=7)と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした。(C) グルコースを除き、1 μg/mLオリゴマイシンAで臍島を処理した後、20 mM メチルピルビン酸(MP)刺激を行った際の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=6)。黒線は $[ATP]_c$  (B, C)もしくは $[ATP]_m$  (A)を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



**Figure 12. 単離膵島におけるグルタミン/ロイシン刺激時の $[ATP]_c$ 、 $[ATP]_m$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1(B、D、F)またはmitGO-ATeam1(A、C、E)を発現させ、fura2をロードした。(A、B) 低グルコース(2.8 mM)条件で10 mMのロイシン(Leu)刺激を行った際の、 $[ATP]_m$  (A; n=5)あるいは $[ATP]_c$  (B; n=4)と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした。(C、D) 低グルコース(2.8 mM)条件で10 mMのグルタミン(Gln)刺激を行った際の、 $[ATP]_m$  (C; n=3)あるいは $[ATP]_c$  (D; n=5)と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした。(E、F) 低グルコース(2.8 mM)かつ10 mMグルタミン(Gln)を含んだ条件で10 mMのロイシン(Leu)刺激を行った際の、 $[ATP]_m$  (E; n=5)あるいは $[ATP]_c$  (F; n=5)と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした。黒線は $[ATP]_c$  (B、D、F)もしくは $[ATP]_m$  (A、C、E)を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。

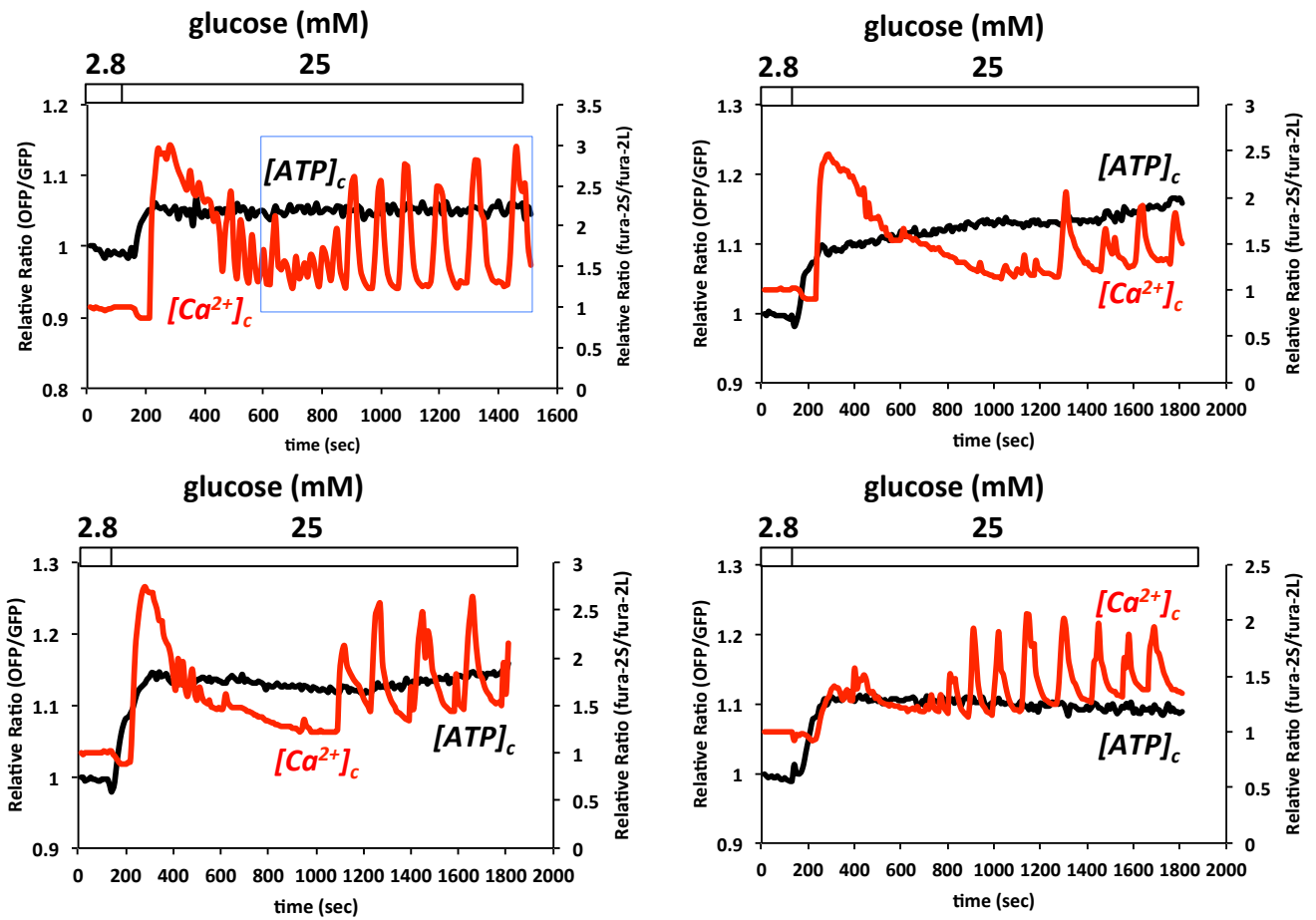




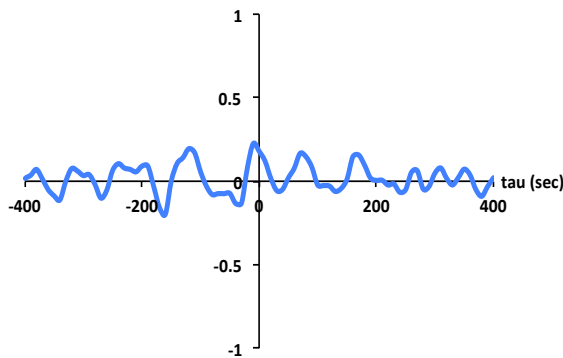
**Figure 13. オリゴマイシンA存在下の単離膵島におけるグルタミン/ロイシン刺激時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させ、fura2をロードした。低グルコース(2.8 mM)かつ10 mMグルタミン(Gln)を含んだ条件で1 µg/mLオリゴマイシンAで膵島を処理した後、10 mMのロイシン(Leu)刺激を行った際の、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=6)。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。

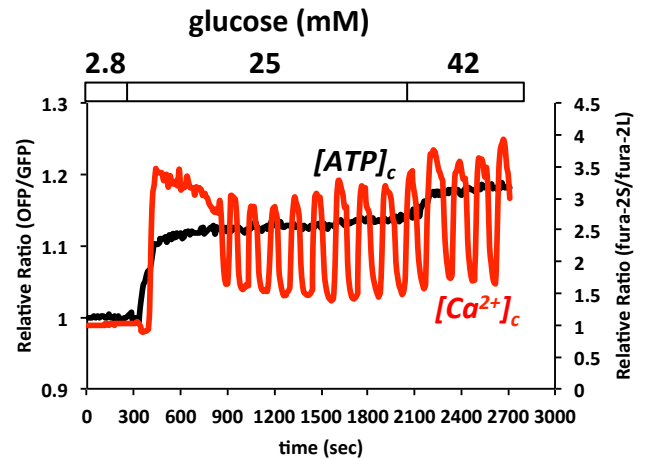
A



B

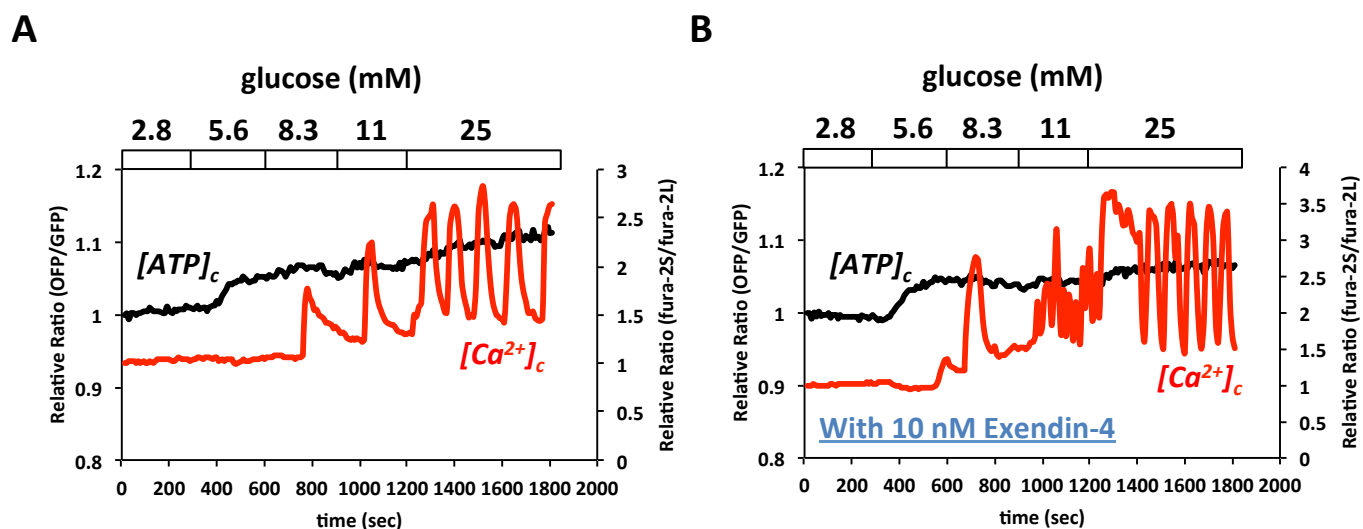


C



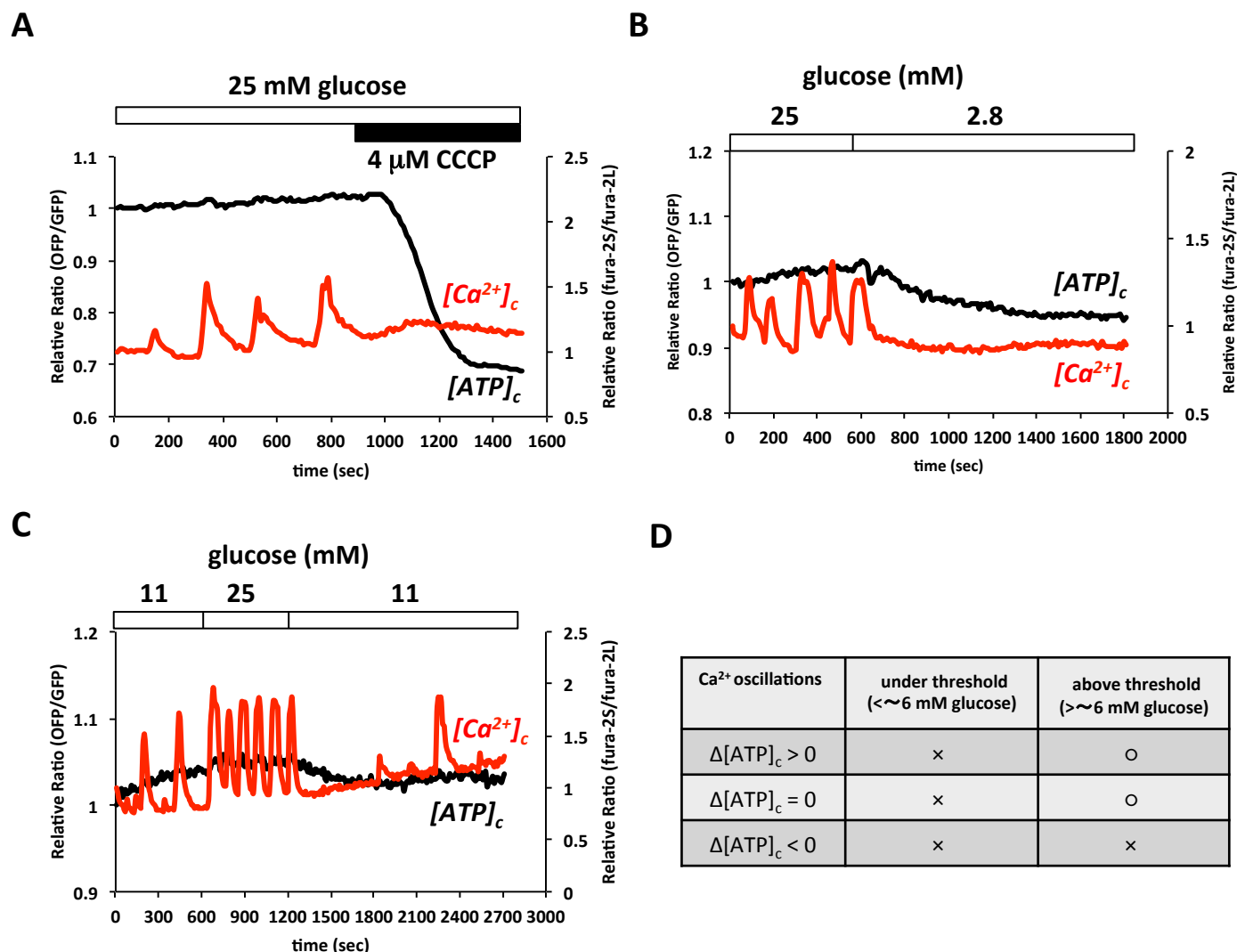
**Figure 14. 単離膵島におけるグルコース刺激時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動とその相関**

単離膵島にGO-Ateam1を発現させ、fura2をロードした。(A) 25 mMのグルコース刺激を行い、 $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションする際の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした( $n=15$ )。ここに示した4つのグラフはそれぞれ異なる膵島でイメージを行ったものである。(B) Aで示されたグラフの中で青長方形で囲まれた部分について $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ との相互相関解析を行った。時間差をx軸、相互相関係数をy軸で表している。(C) 25 mMグルコース刺激により $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションしている状態でグルコース濃度を42 mMにまで上げた時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした( $n=6$ )。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



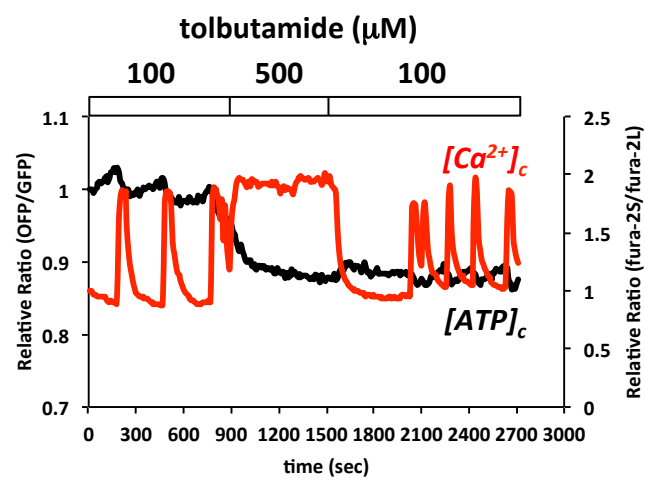
**Figure 15. 単離膵島における段階的グルコース刺激時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させ、fura2をロードした。(A) 2.8 mMグルコース条件で膵島を前培養した後、グルコース濃度を段階的に25 mMまで上げた際の、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=12)。(B) 2.8 mMグルコース条件で膵島を前培養した後、10 nMエキセンジン-4存在下でグルコース濃度を段階的に25 mMまで上げた際の、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=9)。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



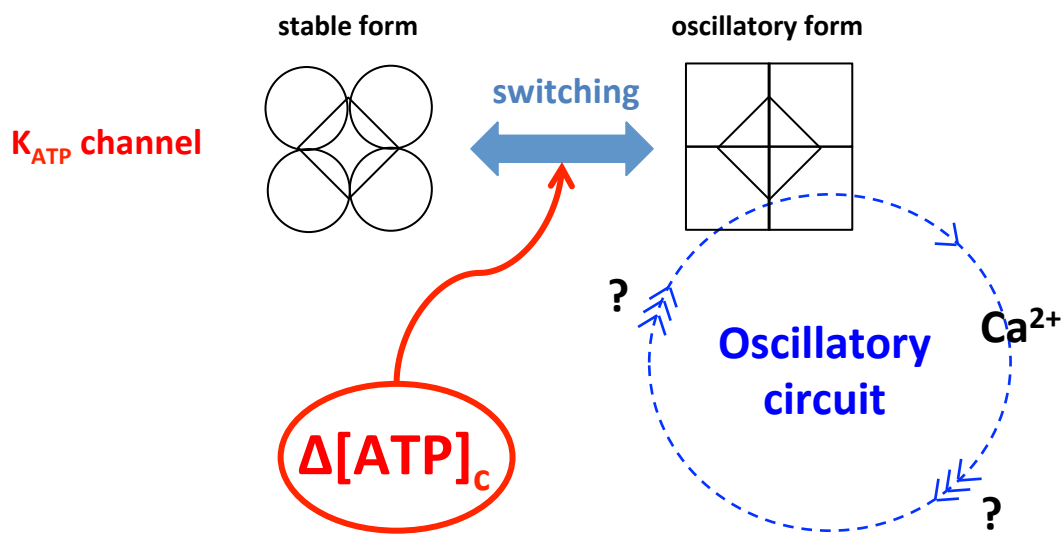
**Figure 16. 単離膵島におけるエネルギー代謝阻害、抑制時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させ、fura2をロードした。(A) 25 mMグルコース条件で $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションしている際に4  $\mu$ M CCCP刺激を行い、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=5)。(B) 25 mMグルコース条件で $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションしている時にグルコース濃度を2.8 mMまで低下させ、 $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=5)。(C) 11 mMグルコース条件で $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションしている状態でグルコース濃度を25 mMまで上げた。さらに11 mMまで再び戻した時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした(n=11)。(D)  $[Ca^{2+}]_c$ オシレーションの有無とグルコース濃度、 $[ATP]_c$ との関係性。 $\Delta[ATP]_c$ は $[ATP]_c$ の変化を表す。グルコース濃度が閾値以下の場合には $Ca^{2+}$ オシレーションは見られない。閾値以上の場合、 $\Delta[ATP]_c$ が0以上の時には $Ca^{2+}$ オシレーションは観察されるが、 $\Delta[ATP]_c$ が負の時には観察されない。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



**Figure 17. 単離膵島におけるトルブタミド処理時の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ の挙動**

単離膵島にGO-ATeam1を発現させ、fura2をロードした。2.8 mMグルコース条件で膵島を前培養し、その後100  $\mu$ Mトルブタミド条件で $[Ca^{2+}]_c$ がオシレーションしている時にトルブタミド濃度を500  $\mu$ Mまで上げた。さらにその後再びトルブタミド濃度を100  $\mu$ Mに戻した際の $[ATP]_c$ と $[Ca^{2+}]_c$ を同時にモニターした。黒線は $[ATP]_c$ を、赤線は $[Ca^{2+}]_c$ を表している。



**Figure 18. モデル図**

$K_{ATP}$  チャンネル、 $Ca^{2+}$  オシレーション、ATP の関係を表したモデル図。 $K_{ATP}$  チャンネルにはオシレーション状態と (oscillatory form) と安定状態 (stable form) という2つの状態があり、リガンド濃度の変化に応じてこの2つの状態のいずれかをとりと想定した。ATP はオシレーションをする因子ではなく、 $K_{ATP}$  チャンネルの2つの状態の切り替えに重要であると考えた。